

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



# دانشگاه آزاد اسلامی

## واحد علوم و تحقیقات

رساله دکتری رشته شیلات (Ph.D)

### موضوع

بررسی پلی مورفیسم ماهی سوکلا *Rachycentron canadum*  
در خلیج فارس و دریای عمان به روش PCR-RFLP

استاد راهنما

دکتر بهرام کاظمی دمنه

استادان مشاور

دکتر مهدی سلطانی

دکتر سید محمد رضا فاطمی

نگارنده

مریم طلا

سال تحصیلی ۱۳۸۸-۱۳۸۹

## سپاسگزاری ها

از جناب آقای دکتر بهرام کاظمی دمنه استاد راهنما، جناب آقای دکتر مهدی سلطانی و جناب آقای دکتر محمد رضا فاطمی مشاوران محترم پایان نامه و نیز جناب آقای دکتر ابطحی و جناب آقای دکتر حسین عمادی که داوری پایان نامه را عهده دار شدند قدردانی می گردد.

همچنین از جناب آقای براهیمی قلعه قاضی ریاست محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد قشم به خاطر حمایت از اینجانب در مدت زمان انجام مراحل اجرایی پایان نامه سپاسگزاری می شود.

از سرکار خانم آمنه کوچکی کارشناس محترم مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشکده پزشکی دانشگاه شهید بهشتی که در انجام واکنش PCR-RFLP نهایت همکاری را نمودند تشکر می گردد.

و با سپاس از جناب آقای مهندس فرامرز لالویی ریاست محترم بخش بیوتکنولوژی پژوهشکده اکولوژی دریای خزر که تجربیات خویش را در اختیار اینجانب قرار دادند.

تقدیم به

استاد فرهیخته جناب آقای دکتر بهرام کاظمی دمنه

## فهرست مطالب

عنوان	صفحه
چکیده .....	۱
مقدمه .....	۲
بخش اول: کلیات .....	۵
۱-۱- معرفی ماهی سوکلا <i>Rachycentron canadum</i> .....	۶
۲-۱- ژنتیک جمعیت ماهی و نشانگرهای مولکولی و کاربرد آنها در شیلات و آبزی پروری ....	۱۲
۳-۱- طبقه بندی نشانگرهای ژنتیکی و جایگاه تحقیق .....	۱۴
۴-۱- ژنوم میتوکندری mtDNA .....	۱۵
۵-۱- واکنش زنجیره ای پلی مرز Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	۱۸
۶-۱- الکتروفورز ژل آگارز .....	۲۴
۷-۱- الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید .....	۲۶
۸-۱- چند شکلی طولی قطعات محدود (RFLP) و آنزیم های برش دهنده (نشانگر مولکولی PCR-RFLP) .....	۲۶
۹-۱- پیشینه مطالعات مولکولی انجام شده در آبزیان .....	۳۰
۱-۹-۱- پیشینه مطالعات مولکولی انجام شده در ماهی سوکلا .....	۳۰
۲-۹-۱- پیشینه مطالعات مولکولی انجام شده به روش PCR- RFLP در آبزیان ایران .....	۳۱
۳-۹-۱- پیشینه مطالعات مولکولی انجام شده به روش PCR- RFLP در آبزیان جهان .....	۳۲
بخش دوم: مواد و روش ها .....	۳۵
۱-۲- مواد، وسایل و دستگاه های مورد نیاز .....	۳۶
۲-۲- روش انجام تحقیق .....	۴۲
۱-۲-۲- نمونه برداری .....	۴۲
۲-۲-۲- استخراج DNA .....	۴۲
۳-۲-۲- تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده .....	۴۵
۱-۳-۲-۲- تعیین کمیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه بیوفتومتر .....	۴۵
۲-۳-۲-۲- بررسی کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه الکتروفورز .....	۴۶
۴-۲-۲- ژن های مورد بررسی .....	۴۷
۵-۲-۲- طراحی پرایمر .....	۴۷

## ادامه فهرست مطالب

عنوان	صفحه
۶-۲-۲- تکثیر ژن هدف با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) .....	۴۸
۷-۲-۲- بررسی کمیت و کیفیت محصول PCR .....	۴۹
۸-۲-۲- انتخاب آنزیم های برشی .....	۴۹
۹-۲-۲- هضم آنزیمی محصول PCR (RFLP) .....	۵۱
۱۰-۲-۲- آشکارسازی قطعات حاصل از هضم آنزیمی با استفاده از ژل آگارز .....	۵۲
۱۱-۲-۲- آشکارسازی قطعات حاصل از هضم آنزیمی با استفاده از ژل پلی اکریل آمید .....	۵۲
۱۲-۲-۲- آنالیز آماری و پردازش داده ها .....	۵۵
<b>بخش سوم: نتایج</b> .....	۵۶
۱-۳- ارزیابی کمیت و کیفیت DNA با استفاده از بیوفتومتر و ژل آگارز .....	۵۷
۲-۳- ارزیابی کمیت و کیفیت محصول PCR با استفاده از ژل آگارز .....	۵۷
۳-۳- بازهای بررسی شده در هضم آنزیمی محصول PCR ژن COI و ژن NADH2 .....	۵۸
۴-۳- الگوهای بانندی حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR ژن COI .....	۵۹
۵-۳- الگوهای بانندی حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR ژن NADH2 .....	۶۳
<b>بخش چهارم: بحث</b> .....	۶۵
۱-۴- اشاره ای بر اهمیت بررسی تنوع ژنتیکی در آبزیان .....	۶۶
۲-۴- اشاره ای بر دلایل انتخاب گونه و روش PCR-RFLP .....	۶۶
۳-۴- مقایسه تعداد باز مورد بررسی در مطالعات مشابه .....	۶۷
۴-۴- مقایسه الگوی بانندی هضم آنزیمی محصول PCR نمونه ها در این بررسی با الگوی بانندی مورد انتظار بر اساس بانک جهانی ژن (ژن بانک) .....	۶۷
۵-۴- تفسیر مطالعات انجام شده در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی در ماهی سوکلا .....	۶۸
۶-۴- دلایل مطرح شده برای عدم مشاهده چندشکلی در تعدادی از مطالعات به روش PCR-RFLP .....	۶۹
۷-۴- جمع بندی .....	۷۲
پیشنهادات .....	۷۴
منابع فارسی .....	75
منابع انگلیسی .....	77

## فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول ۱-۱- رده بندی ماهی سوکلا .....	۷
جدول ۲-۱- آمار صید ماهی سوکلا در آب های ایرانی خلیج فارس و دریای عمان طی سال های ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۸ .....	۹
جدول ۱-۲- مشخصات مواد مصرفی مورد استفاده برای استخراج DNA با روش فنل کلروفرم .....	۳۶
جدول ۲-۲- مشخصات مواد مصرفی مورد استفاده برای انجام واکنش PCR و تکثیر ژن هدف .....	۳۷
جدول ۳-۲- مشخصات مواد مصرفی مورد استفاده برای انجام الکتروفورز ژل آگارز .....	۳۸
جدول ۴-۲- مشخصات مواد مصرفی مورد استفاده برای انجام الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید .....	۳۹
جدول ۵-۲- مشخصات تجاری آنزیم های برشی (Restriction enzymes) مورد استفاده .....	۴۰
جدول ۶-۲- مشخصات وسایل غیر مصرفی و دستگاه های مورد استفاده .....	۴۱
جدول ۷-۲- مشخصات ژن ها و پرایمرهای مورد استفاده .....	۴۸
جدول ۸-۲- برنامه حرارتی و زمان بندی دستگاه ترموسایکلر برای انجام واکنش PCR .....	۴۹
جدول ۹-۲- جایگاه های برش، تعداد قطعات، طول هر قطعه و طول کل قطعات مورد انتظار پس از تأثیر هر یک از آنزیم های <i>MboII</i> ، <i>AseI</i> ، <i>HphI</i> ، <i>BsrI</i> ، <i>HaeIII</i> ، <i>ApoI</i> ، <i>AluI</i> در محصول PCR ژن میتوکندریایی ND2 در ماهی سوکلا (بر اساس توالی نوکلئوتیدی گزارش شده در بانک جهانی ژن) .....	۵۰
جدول ۱۰-۲- جایگاه های برش، تعداد قطعات، طول هر قطعه و طول کل قطعات مورد انتظار پس از تأثیر هر یک از آنزیم های <i>MboII</i> ، <i>ScrfI</i> ، <i>BsrI</i> ، <i>HaeIII</i> ، <i>ApoI</i> ، <i>AluI</i> در محصول PCR ژن میتوکندریایی COI در ماهی سوکلا (بر اساس توالی نوکلئوتیدی گزارش شده در بانک جهانی ژن) .....	۵۱
جدول ۱۱-۲- ترکیبات محلول رنگ آمیزی ژل پلی اکریل آمید به روش نیترا ت نقره .....	۵۴
جدول ۱-۳- باز کد شناسایی و محل های برش، تعداد باز مورد شناسایی، تعداد محل های برش و تعداد بازهای مورد بررسی در هضم آنزیمی محصول PCR هر یک از دو ژن COI و ND2 و نیز تعداد کل بازهای مورد بررسی .....	۵۸
جدول ۲-۳- تعداد قطعات و طول هر قطعه حاصل از تأثیر هر یک از آنزیم های مورد استفاده در هضم آنزیمی محصول PCR ژن میتوکندریایی COI در ماهی سوکلا در هر چهار منطقه مورد مطالعه .....	۵۹

## ادامه فهرست جداول

صفحه	عنوان
	جدول ۳-۳- تعداد قطعات و طول هر قطعه حاصل از تأثیر هر یک از آنزیم های مورد استفاده در هضم آنزیمی محصول PCR ژن میتوکندریایی NADH2 در ماهی سوکلا در هر چهار منطقه
۶۳	مورد مطالعه .....



## فهرست شکل ها

صفحه	عنوان
۶	شکل ۱-۱- پراکنش جهانی ماهی سوکلا .....
۷	شکل ۲-۱- ماهی سوکلا <i>Rachycentron canadum</i> .....
۱۰	شکل ۳-۱- ماهی سوکلا پس از صید از قفس های پرورش ماهی .....
۱۰	شکل ۴-۱- تولید جهانی حاصل از پرورش ماهی سوکلا در سال های ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۸ .....
۱۱	شکل ۵-۱- تولید جهانی حاصل از صید ماهی سوکلا در سال های ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۸ .....
۱۴	شکل ۶-۱- طبقه بندی انواع نشانگرهای ژنتیکی .....
۲۱	شکل ۷-۱- چرخه اول از یک واکنش زنجیره ای پلی مرار .....
۲۲	شکل ۸-۱- نمایش تغییرات دمایی در واکنش زنجیره ای پلی مرار .....
۲۳	شکل ۹-۱- رابطه بین تعداد کپی نهایی توالی هدف با تعداد چرخه PCR .....
۲۸	شکل ۱۰-۱- مبنای RFLP در رشته های الف و ب مولکول دو رشته ای DNA .....
۴۷	شکل ۱-۲- جایگاه دو ژن COI و NADH2 در ژنوم میتوکندریایی انسان .....
۵۷	شکل ۱-۳- محصول PCR ژن COI .....
	شکل ۲-۳- الگوی بانندی حاصل از هضم محصول PCR ژن COI توسط آنزیم <i>AfuI</i>
۶۰	مربوط به سه نمونه از چهار منطقه مورد مطالعه .....
	شکل ۳-۳- الگوی بانندی حاصل از هضم محصول PCR ژن COI توسط آنزیم <i>ScrFI</i>
۶۰	مربوط به سه نمونه از چهار منطقه مورد مطالعه .....
	شکل ۴-۳- الگوی بانندی حاصل از هضم محصول PCR ژن COI توسط آنزیم <i>HaeIII</i>
61	مربوط به سه نمونه از چهار منطقه مورد مطالعه .....
	شکل ۵-۳- الگوی بانندی حاصل از هضم محصول PCR ژن COI توسط آنزیم <i>BsrI</i>
۶۱	مربوط به سه نمونه از چهار منطقه مورد مطالعه .....
	شکل ۶-۳- الگوی بانندی حاصل از هضم محصول PCR ژن COI توسط آنزیم <i>MboII</i>
۶۲	مربوط به سه نمونه از چهار منطقه مورد مطالعه .....
	شکل ۷-۳- الگوی بانندی حاصل از هضم محصول PCR ژن COI توسط آنزیم <i>ApoI</i>
۶۲	مربوط به سه نمونه از چهار منطقه مورد مطالعه .....

## چکیده

ماهی سوکلا که بومی آب های جنوبی کشور و برخوردار از استقبال قابل توجهی در بازارهای داخلی و خارجی می باشد، یک گونه دریایی عالی از نظر آبی پروری نیز به شمار می آید. به طوری که سازمان شیلات ایران پرورش این گونه را در آب های جنوب کشور بررسی می نماید. از آنجا که هر گونه بهره برداری صحیح از منابع آبی (صید و پرورش)، مستلزم شناسایی و تعیین ترکیب ژنی ذخایر و حفظ تنوع ژنتیکی جمعیت های وحشی آن می باشد، لذا اجرای این پروژه مورد نظر قرار گرفت. در این بررسی، ۲ یا ۳ سانتی متر از بافت باله تعداد ۱۲۰ عدد ماهی جدا گردید که از آب های مناطق سیستان و بلوچستان، بوشهر، هرمزگان و خوزستان به صورت تصادفی جمع آوری شده بودند. DNA به روش فنل کلروفرم استخراج شد و محصول PCR دو ژن میتوکندریایی CoI و ND2، تقریباً به طول ۱۰۶۰ و ۱۴۵۰ جفت باز به دست آمد. در این پژوهش با استفاده از ۱۳ آنزیم برشی (۴ آنزیم برای هر دو ژن مشترک بود)، تعداد ۲۰۵ جفت باز (از مجموع ۲۵۱۰ جفت باز، معادل ۸/۳ درصد از نواحی ژنی مورد بررسی) به طور مستقیم بررسی گردید. لیکن الگوهای بانندی هضم آنزیمی محصول PCR هر دو ژن CoI و ND2 حاصل از الکتروفورز، در تمام نمونه ها هم شکل (مونومورف) بوده و چند شکلی (پلی مورفسم) نشان ندادند. عدم مشاهده چندشکلی را شاید بتوان به نامناسب بودن دو ژن CoI و ND2 برای نشان دادن تنوع درون گونه ای نسبت داد. اما به طور کلی عدم تنوع ژنتیکی و یا کاهش قابل توجه آن بین افراد، در مناطقی که امکان مهاجرت و جابجایی ماهیان از منطقه ای به منطقه دیگر (جریان ژنی) وجود دارد، گزارش گردیده است. لذا عدم مشاهده چند شکلی در مطالعه حاضر، ممکن است چندان دور از واقعیت نباشد. اما از سوی دیگر، محققین پراکنش جمعیت ها در نواحی مختلف را تحت تأثیر عوامل مختلف فیزیکی و اکولوژیک نیز دانسته اند، لذا اگرچه ماهی سوکلا از گروه ماهیان مهاجر است، اما با توجه به تفاوت های نسبی محیطی (به ویژه دما و شوری) در نواحی شرقی و غربی خلیج فارس و دریای عمان، این امکان نیز هست که گروه های ژنتیکی متفاوتی از این گونه وجود داشته باشند. بدیهی است استفاده از سایر نواحی ژنی و تعداد نمونه ها و آنزیم های بیشتر می تواند نتایج دقیق تری را نشان دهد. از آنجا که هیچ یک از دو ژن مورد بررسی، تنوع ژنتیکی یا چند شکلی را در بین افراد داخل یک منطقه و یا افراد بین مناطق مختلف نشان ندادند، لذا انجام هر گونه آنالیز آماری برای محاسبه تنوع هاپلو تیپ ها یا تنوع نوکلئوتیدها و رسم درخت خویشاوندی بین افراد یا گروه ها با بهره گیری از نرم افزارهای اختصاصی امکان پذیر نگردید.

## مقدمه

بنا بر پیش بینی FAO، تولید جهانی ماهیان دریایی پرورشی در سال ۲۰۲۵ به ۱۰ میلیون تن خواهد رسید. این در حالی است که منابع آبی بزرگ موجود در شمال و جنوب کشور که بر اساس محاسبات انجام شده توان تولید بیش از یک میلیون تن ماهی پرورشی را دارند، همچنان دست نخورده می باشند که با برنامه ریزی مناسب می توان زمینه بهره برداری از این ظرفیت بالقوه را فراهم نمود (ایزدی و بشارت، ۱۳۸۵).

ماهی سوکلا به عنوان یک گونه دریایی عالی از نظر آبرزی پروری به شمار می آید (Liao et al., 2004; Benetti et al., 2007; in: Benetti et al., 2008; Liao et al., 2004; Nakamura, 2007 in: Benetti et al., 2008) تولید تجاری ماهی سوکلا در اواخر دهه ۱۹۹۰ و از آسیای جنوب شرقی آغاز گردیده (Chang et al., 1999; Mai et al., 2009) و در سراسر دنیا از جمله استرالیا و امریکا به سرعت توسعه می یابد (Holt et al., 2007 in: Resely et al., 2006) ماهی سوکلا در سراسر دنیا قیمت زیادی دارد (Arnold et al., 2002 in: Resely et al., 2006) و یک گونه قابل توجه در آبرزی پروری محسوب می شود که استقرار شرایط مورد نیاز برای رشد مطلوب آن، نقشی کلیدی در توسعه آبرزی پروری این گونه ایفا خواهد نمود (Resely et al., 2006).

بر اساس مطالعات انجام شده توسط شرکت نروژی REFA، آب های ساحلی کشور در شمال و جنوب دارای ظرفیت تولید بیش از ۴۵۰/۰۰۰ تن ماهی در قفس می باشند. در گزارش این شرکت، ظرفیت تولید استان هرمزگان با ۹۰۰ کیلومتر نوار ساحلی، ۷۵۰۰۰ تا ۱۲۰/۰۰۰ تن اعلام گردیده است (ایزدی و بشارت، ۱۳۸۵). هم اکنون سازمان شیلات ایران پرورش ماهی سوکلا در قفس را در آب های ساحلی این استان بررسی می نماید. از سوی دیگر، میزان صید ماهی سوکلا از صیدگاه های استان هرمزگان که طی سال های ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۸، جمعاً ۶۰۹۶ کیلوگرم برآورد گردیده، در صورت بهینه نمودن روش های صید، قابل افزایش است (اداره کل اطلاعات و آمار سازمان شیلات ایران، ۱۳۸۹). اما هر گونه بهره برداری صحیح از منابع آبی، مستلزم شناسایی و تعیین ترکیب ذخایر می باشد. در حقیقت شناسایی و تعیین ترکیب ذخایر، از اصول صحیح مدیریت شیلاتی است (Waldman, 1999). در حالی که برنامه های شرکت های شیلاتی معمولاً به منظور دستیابی به اهداف آن شرکت ها طراحی می شوند که صرفاً بهره برداری از منابع دریاها می باشد، بدون آن که

ساختار ژنتیکی جمعیت های طبیعی را مورد توجه قرار دهند (Daley, 1993; in: Hilsdorf et al., 2002)، حال آن که اجرای موفق برنامه های تولید آبزیان، به حفظ تنوع ژنتیکی جمعیت های وحشی آنان بستگی دارد (Vrijenhoek et al., 1995; in: Hilsdorf et al., 2002).

ماهی سوکلا که بومی آب های جنوبی کشور و برخوردار از اهمیت و مقبولیت قابل توجهی در بازارهای داخلی می باشد، همانند سایر گونه های با ارزش، نیازمند اعمال مدیریت صحیح بر ذخایر آن از طریق در نظر گرفتن تنوع ژنتیکی (پلی مورفیسم<sup>۱</sup>) جمعیت های آن و پراکنش این جمعیت ها در برنامه های صید سالانه می باشد. افزایش صید و همچنین آلودگی های مختلف در خلیج فارس و دریای عمان، مسئولین را متوجه این امر ساخته که تنها راه مؤثر جهت تأمین ثبات و پایداری و همچنین توسعه کیفی و کمی ذخایر موجود، اصلاح مدیریت بهره برداری از ذخایر است. اعمال هر گونه مدیریت بر ذخایر آبزیان، زمانی با موفقیت همراه است که شناسایی دقیق و روشنی از ذخایر ژنتیکی گونه های ساکن در منطقه صورت پذیرد و ژنوتیپ های مختلف از گونه هایی که محدوده صید متفاوتی را در بر می گیرند شناسایی شده و مدیریت مناسبی در برداشت از این ذخایر اعمال شود. برداشت ناآگاهانه بدون در نظر گرفتن ذخایر ژنتیکی و ژنوتیپ های موجود از هر جمعیت علاوه بر این که صدمات جبران ناپذیری بر اکوسیستم منطقه وارد خواهد نمود، در دراز مدت سبب افزایش جمعیت های مختلف از گونه های غالب نیز خواهد گردید.

انتظار می رود که در طی دوره تکامل، مثال های مختلف زیادی از هر نوع جهش در هر گونه وجود داشته باشد که تعداد و درجه انواع مختلف جهش، تنوع ژنتیکی درون یک گونه را تعریف می نماید (Liu and Cordes, 2004) و بنا بر آنچه گفته شد، اندازه گیری تنوع ژنتیکی در جمعیت های وحشی ماهیان یا ذخایر آبزی پروری به منظور درک و مدیریت مؤثر این جمعیت ها یا ذخایر، ضروری است (Çiftci, 2003) و (Okumuş and). از این رو اهمیت آگاهی از وجود پلی مورفیسم در جمعیت های مختلف، یکی از موضوعات مهم برای بهره برداری صحیح از منابع آبزیان در پیکره های آبی می باشد.

شناسایی جمعیت ماهیان با ارزشی از جمله ماهی سوکلا و شناخت ژنوتیپ ها و هاپلوتیپ های موجود از هر جمعیت در آب های جنوبی کشور، نه فقط در راستای حفظ ذخایر اهمیت دارد، بلکه این اطلاعات راهکارهای مناسبی را در ارتباط با تکثیر و پرورش و مولد سازی و همچنین بازسازی ذخایر این گونه در آینده نزدیک به محققین ارائه می نماید. از این رو اولین اولویت مورد نظر در این تحقیق، پاسخ به این سوال است که آیا در جمعیت ماهی سوکلای آب های جنوبی کشور، پلی مورفیسم وجود دارد؟ در حقیقت کمبود مطالعات تعیین تنوع پذیری ژنتیکی ماهی سوکلا، ما را به انجام پژوهش حاضر ترغیب نمود که نتایج آن ممکن است به طراحی و کاربرد استراتژی های حفاظت ژنتیکی در برنامه های کنترل ذخایر این گونه و نیز تکثیر و پرورش آن کمک نماید. بدین منظور در این بررسی، شناسایی ذخایر ژنتیکی ماهی سوکلا در مناطق مورد بررسی (محل های صید در آب های جنوبی کشور) با استفاده از روش PCR-RFLP و با در نظر گرفتن فرضیه ها و اهداف ذیل انجام گردید.

#### فرضیه های تحقیق:

- ۱- ماهی سوکلا در مناطق شمالی خلیج فارس و دارای عمان دارای تنوع ژنتیکی می باشد.
- ۲- روش PCR-RFLP، در صورت وجود تنوع ژنتیکی در جمعیت های احتمالی ماهی سوکلا، از کارآیی لازم برای نشان دادن آن برخوردار است.

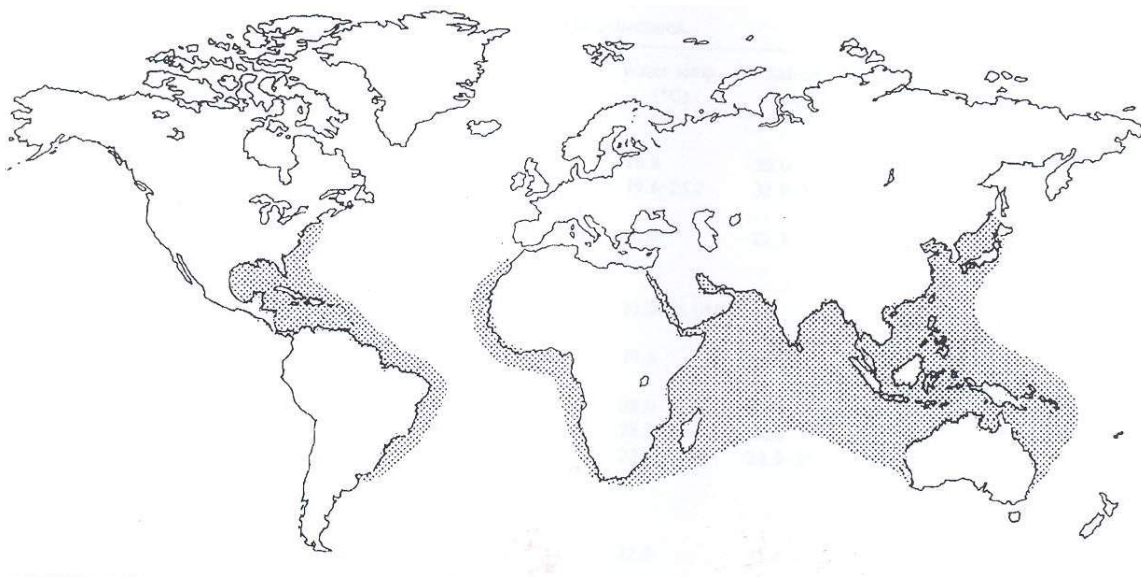
#### اهداف تحقیق:

- ۱- آشکار نمودن تنوع ژنتیکی (در صورت وجود) در درون و مابین جمعیت های احتمالی ماهی سوکلا در مناطق مورد بررسی.
- ۲- تعیین میزان تنوع ژنتیکی در درون و مابین جمعیت های احتمالی ماهی سوکلا.

## بخش اول : کلیات

## ۱-۱- معرفی ماهی سوکلا *Rachycentron canadum*

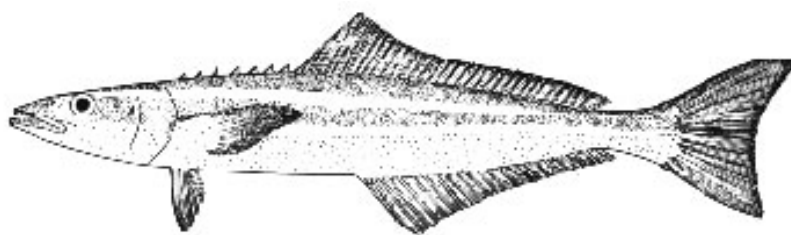
ماهی سوکلا با نام علمی *Rachycentron canadum* تنها گونه از خانواده Rachycentridae است. این گونه در آب های دریایی گرمسیر و نیمه گرمسیر به غیر از مرکز و شرق اقیانوس آرام پراکنش جهانی دارد (شکل ۱-۱) (Liao et al., 2004; Ditty and shaw, 1992; Chen, 1986; and Rainville, 1975). ماهی سوکلا که به صورت انفرادی یا در گروه های کوچک حرکت می کند در هر دو منطقه آب های ساحلی و فلات قاره زیست می کند و افراد بزرگ سال آن در خورها و خلیج های کوچک و مصب ها و در اعماق ۱۲۰۰ متر یافت شده اند. ظاهراً ماهی سوکلا قبل از آن که به مناطق دور از ساحل برود که غالباً ماهیان بزرگتر صید می شوند، در بخشی از مرحله پیش از بلوغ در نواحی نزدیک ساحل به سر می برد. به نظر می رسد که دما، عامل اصلی در تعیین محدوده زیست آنها می باشد. اگر چه نمونه هایی در دماهای ۱۶ تا ۳۲ درجه سانتی گراد جمع آوری شده اند، اما به نظر می رسد که دماهای بالای ۲۰ درجه سانتی گراد را ترجیح می دهند. ماهی سوکلا دامنه وسیعی از شوری را تحمل می کند، به طوری که نمونه هایی از آب های با شوری ۲۲ تا ۴۴ ppt جمع آوری شده اند و در سیستم های پرورشی با شوری کمتر از ۵ ppt نیز پرورش یافته اند (Kaiser and Holt, 2005).



شکل ۱-۱- پراکنش جهانی ماهی سوکلا

اقتباس از: Shaffer and Nakamura, 1989

ماهی سوکلا بدن طولی دارد و تا وزن ۶۱ کیلوگرم و طول ۲ متر رشد می کند. جنس ماده بزرگتر است و نسبت به جنس نر رشد سریع تری دارد. رنگ بدن این ماهی در پشت نسبتاً قهوه ای و در سطح شکمی نسبتاً سفید است و یک نوار جانبی سیاه رنگ از حدود چشم ماهی در امتداد طول بدن تا دم وجود دارد. اولین باله پشتی متشکل از ۷ تا ۹ خار سخت کوتاه و مجزا و دومین باله پشتی طویل با بخش قدامی بلند می باشد (شکل ۱-۲). گمان می رود ماهی سوکلا تا بیش از ۱۵ سال در محیط وحش زیست نماید (Kaiser and Holt, 2005).



شکل ۱-۲- ماهی سوکلا *Rachycentron canadum*

این ماهی گوشتخوار فرصت طلب است و از بسیاری انواع ماهیان، خرچنگ، میگو و اسکویید تغذیه می کند و اطلاعات مربوط به بررسی محتویات شکم آن نشان می دهد که سخت پوستان به ویژه خرچنگ های شناگر<sup>۱</sup> را ترجیح می دهد (Kaiser and Holt, 2005).

جدول ۱-۱ رده بندی این گونه را نشان می دهد.

جدول ۱-۱- رده بندی ماهی سوکلا

<b>Class:</b>	Osteichtyes
<b>Superorder:</b>	Acanthopterygii
<b>Order:</b>	Perciformes
<b>Suborder:</b>	Percoidei
<b>Family:</b>	Rachycentridae
<b>Genus:</b>	<i>Rachycentron</i>
<b>Scientific name:</b>	<i>Rachycentron canadum</i>
<b>Common name:</b>	Cobia

اقتباس از : Shaffer and Nakamura, 1989



اندازه و سن دقیق ماهی سوکلا وقتی که به رسیدگی جنسی می رسد بسته به محل، متفاوت است. اما تحقیقات نشان داده که نرها معمولاً در سن ۱ تا ۲ سالگی و ماده ها در سن ۲ تا ۳ سالگی بالغ می شوند و در آب های با دمای ۲۳ تا ۲۷ درجه سانتی گراد در سراسر سال تخم ریزی می کنند. این ماهی دوره تولید مثل طولانی دارد که در آب های امریکا معمولاً از حدود آوریل (فروردین) تا سپتامبر (شهریور) می باشد و ماده ها در طول این فصل چند نوبت تخم ریزی می کنند. اما به طور کلی دمای مناسب برای تخم ریزی ۲۴ تا ۲۹ درجه سانتی گراد و اوج تولید تخم در بهار و پاییز در دمای ۲۴ تا ۲۶ درجه سانتی گراد است. این ماهی در سواحل ایران دارای دو اوج تخم ریزی در بهار و تابستان می باشد و تخم ریزی اصلی، در خرداد ماه انجام می گردد (دقوقی، ۱۳۸۵). ماده ها بسته به اندازه بدن، ۴۰۰/۰۰۰ تا بیش از ۵ میلیون تخم رها می کنند. تخم ها نسبتاً بزرگ به قطر حدود ۱/۳۵ تا ۱/۴۰ میلی متر می باشند، به شدت رنگدانه دارند و تخم های لقاح یافته، شاور، شفاف، مدور و کرم رنگ می باشند. رشد لاروی در این گونه سریع است. طول کل لارو تازه متولد شده ۳/۵ میلی متر است که در روز ششم به ۶/۸ میلی متر می رسد. لاروها در مقایسه با لارو سایر ماهیان دریایی به طور قابل توجهی قوی تر و نسبت به عوامل محیطی مقاوم ترند (Kaiser and Holt, 2005; Liao et al., 2001 and 2004).

ماهی سوکلا مقاوم ترین گونه نسبت به بیماری ها است و در میان گونه های مهم تجاری، سریع ترین رشد را دارد، به طوری که در مناطق گرمسیر مانند تایوان در مدت یک سال قابلیت رسیدن به وزن ۶ الی ۱۰ کیلوگرم را دارا می باشد (Resley et al., 2006; Liao et al., 2004; Faulk and Holt, 2006) و از این رو پرورش آن در سطح جهان رو به گسترش است (Kaiser and Holt, 2005). پرورش لاروی این ماهی آسان است و پرورش آن در تراکم زیاد امکان پذیر می باشد (Liao et al., 2001). رشد چشم گیر، کیفیت خوب گوشت، هزینه کم تولید در مقایسه با سایر گونه ها، ضریب تبدیل غذایی خوب، ارزش بازاری زیاد، وجود تکنولوژی تولید انبوه لارو و سیستم های پرورش متراکم و فوق متراکم و نیز تولید غذای تجاری اختصاصی، از ویژگی های مطلوب ماهی سوکلا جهت آبروی پروری می باشد و به دلیل ارزش تجاری زیاد

این ماهی در بازارهای بین‌المللی، تکنولوژی پرورش این ماهی در چند سال گذشته به سرعت توسعه پیدا کرده است (Liao et al., 2004; Kaiser and Holt, 2005).

این گونه که بومی آب‌های جنوبی ایران نیز می‌باشد و همه ساله بخشی از تولید حاصل از صید آبزیان در جنوب کشور را به خود اختصاص می‌دهد (جدول ۱-۲)، برای پرورش در قفس ایده‌آل است و محبوب‌ترین گونه برای پرورش در قفس‌های دریایی دور از ساحل می‌باشد. علاقه پرورش دهندگان ماهی به تولید ماهی سوکلا و افزایش مستمر تولید این ماهی از زمان معرفی این گونه در دهه ۱۹۹۰ نشان‌دهنده سودمندی پرورش ماهی سوکلا در قفس در مقایسه با سایر ماهیان دریایی می‌باشد (Liao et al., 2004).

جدول ۱-۲- آمار صید ماهی سوکلا در آب‌های ایرانی خلیج فارس و دریای عمان طی سال‌های ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۸ (ارقام به کیلوگرم)

سال	استان	هرمزگان	بوشهر	سیستان و بلوچستان	خوزستان	جمع کل
۱۳۸۰		۴۴۳	۲۱۴	۵۲	۲۰	۷۲۹
۱۳۸۱		۴۳۹	۴۵۰	۱۲۴	۱۵	۱۰۲۸
۱۳۸۲		۶۸۶	۴۵۰	۲۲۷	۲	۱۳۶۵
۱۳۸۳		۶۷۴	۶۵۰	۱۴۸	۶	۱۴۷۸
۱۳۸۴		۷۸۰	۴۰۵	۹۳	۱۱۳	۱۳۹۱
۱۳۸۵		۷۹۲	۵۵۰	۱۳۸	۹۴	۱۵۷۴
۱۳۸۶		۹۹۴	۴۶۷	۶۳	۴	۱۵۲۸
۱۳۸۷		۶۹۸	۴۷۳	۱۶۱	۵۳	۱۳۸۵
۱۳۸۸		۵۹۰	۳۷۸	۲۲۸	۰	۱۱۹۶
جمع کل		۶۰۹۶	۴۰۳۷	۱۲۳۴	۳۰۷	۱۱۶۷۴

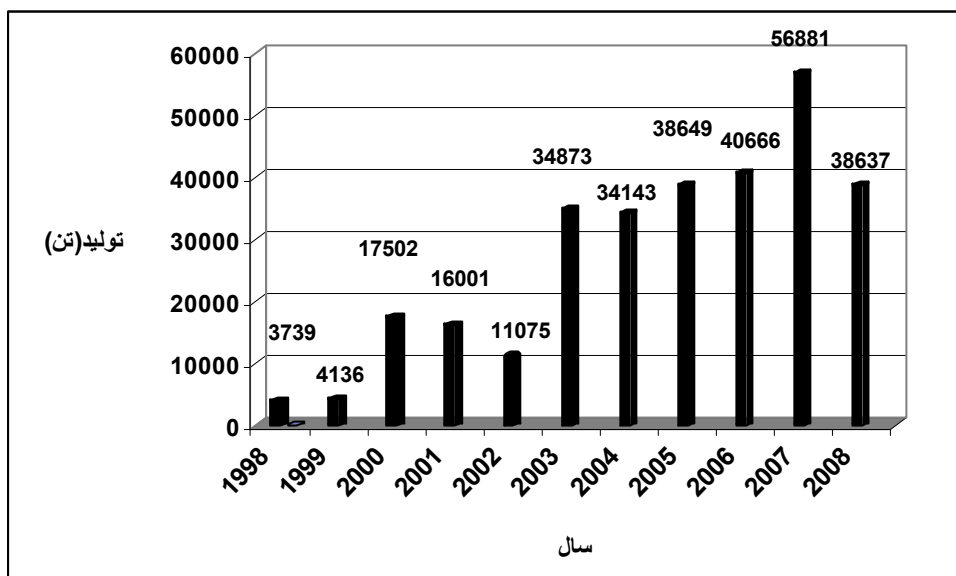
منبع: اداره کل اطلاعات و آمار سازمان شیلات ایران، ۱۳۸۹

چنانچه این ماهی از طریق آبی پروری در سطح وسیعی عرضه شود، پتانسیل بازار به خاطر گوشت سفید و سفتی که دارد قابل توسعه است. به عنوان مثال توسعه تولید ماهی سوکلا در ۵ سال اخیر در تایوان نشان می‌دهد که این گونه می‌تواند به طور سودآوری افزایش یابد (Kaiser and Holt, 2005). پرورش ماهی سوکلا در قفس‌های دریایی در تایوان عمومیت دارد (Su et al., 2001; In: Liao et al., 2004) و در حال حاضر حدود ۸۰ درصد از قفس‌های دریایی در تایوان به پرورش ماهی سوکلا اختصاص

یافته است (Liao et al., 2004). تایوان در حال حاضر دارای یک صنعت تجاری تولید ماهی سوکلا می باشد که در سال ۲۰۰۴ تقریباً ۵۰۰۰ تن ماهی سوکلا تولید کرد که بیشتر آن، پرورشی بود. تایوانی ها تولید ماهیان بازاری ۶ تا ۸ کیلوگرمی را برای صادرات به ژاپن و ماهیان ۸ تا ۱۰ کیلویی را برای مصرف داخلی گزارش کرده اند (شکل ۳-۱) (Kaiser and Holt, 2005). شکل ۴-۱، تولید جهانی حاصل از پرورش ماهی سوکلا را در سال های ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۸ نشان می دهد.



شکل ۳-۱- ماهی سوکلا پس از صید از قفس های پرورش ماهی

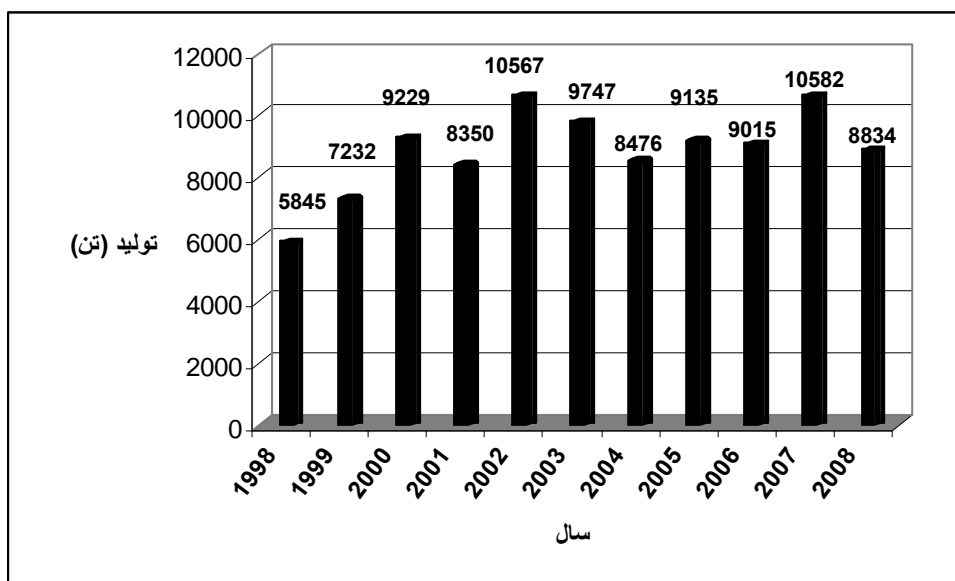


شکل ۴-۱- تولید جهانی حاصل از پرورش ماهی سوکلا در سال های ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۸ (ارقام بر حسب تن)

منبع: FAO, 2010

در سال ۲۰۰۲ تولید جهانی ماهی سوکلا (پرورش) حدود ۱۰۴۱۶ تن توسط کشورهای تایوان، پاکستان، فیلیپین، برزیل و امارات متحده عربی به عنوان ۵ کشور اول تولید کننده اعلام گردیده است (Liao et al., 2004 and Kaiser and Holt, 2005).

آمار تولید جهانی حاصل از صید ماهی سوکلا در سال های ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۸، در شکل ۵-۱، نشان داده شده است.



شکل ۵-۱- تولید جهانی حاصل از صید ماهی سوکلا در سال های ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۸ (ارقام بر حسب تن)  
منبع: FAO, 2010

مقایسه آمار تولید جهانی حاصل از صید و پرورش ماهی سوکلا در سال های ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۸ (شکل ۴-۱ و ۵-۱) نشان می دهد که همواره میزان تولید حاصل از پرورش این ماهی، به طور قابل توجهی بیشتر از میزان تولید حاصل از صید آن بوده است. به طوری که حداکثر تولید حاصل از پرورش آن، به میزان ۵۶۸۸۱ تن در سال ۲۰۰۷ انجام گردیده که در مقایسه با حداکثر تولید حاصل از صید آن، به میزان ۱۰۵۸۲ تن در همان سال، تقریباً ۵ برابر بیشتر است. این امر، قابلیت پرورشی بودن ماهی سوکلا را به روشنی نشان می دهد.

## ۱-۲- ژنتیک جمعیت ماهی و نشانگرهای مولکولی و کاربرد آنها در شیلات و آبرزی پروری

تمام موجودات در نتیجه عملکرد طبیعی سلولی یا اثرات متقابل با محیط، در معرض انواع جهش ها قرار دارند که این امر، تنوع ژنتیکی (پلی مورفیسم یا چندشکلی) را موجب می شود (Liu and Cordes, 2004). تنوع ژنتیکی و اندازه گیری آن دارای اهمیت اساسی در بیان، درک و مدیریت جمعیت و افراد می باشد (Okumuş and Çiftci, 2003). ژنتیک جمعیت به تنهایی می تواند به عنوان علم چگونگی توزیع تنوع ژنتیکی در میان گونه ها، جمعیت ها و افراد تعریف شود (Hanson, 2003; in: Okumuş and Çiftci, 2003). الگوهای تنوع ژنتیکی در میان جمعیت ها می تواند راهنمایی برای درجه جدایی تکاملی جمعیت ها فراهم نماید. به طور کلی هر فنوتیپ یا صفت (قابل توارث) در موجود زنده که با صفت معادل خود در موجود زنده دیگر تفاوت داشته باشد، یک نشانگر محسوب می شود. نشانگرهای ژنتیکی دارای جایگاه های ویژه روی یک کروموزوم می باشند که به عنوان نشانگرهای اختصاصی برای بررسی های ژنومی مورد استفاده قرار می گیرند (Gold steine and Schlotterer, 1998). تفاوت های ژنتیکی به صورت تفاوت در کمیت و کیفیت آلل ها، ژن ها، کروموزوم ها و ترتیب ژن ها روی کروموزوم ها بیان می شوند که درون و مابین جمعیت ها موجودند (Williamson, 2001; Çiftci and Okumuş, 2002). برای آن که این تنوع برای ژنتیک دانا مفید باشد، باید: ۱- وراثت پذیر باشد. ۲- از طریق ایجاد یک نوع فنوتیپ قابل تشخیص یا یک جهش ژنتیکی قابل تشخیص توسط تکنیک های مولکولی، برای محققان قابل شناسایی باشد (Liu and Cordes, 2004).

در دهه ۱۹۶۰، مطالعات اولیه در ژنتیک مولکولی، به نشانگرهای پروتئینی مانند هموگلوبین و ترانسفرین محدود بود و سپس به سرعت به سوی آلوزایم ها (پروتئین های آنزیمی) تغییر یافت (et al., 1995). Ferguson)، به طوری که آلوزایم ها روش غالب مورد استفاده در دهه ۱۹۶۰ و اوایل دهه ۱۹۸۰ گردیدند (Williamson, 2001). اگرچه نشانگرهای پروتئینی و سپس نشانگرهای کروموزومی برای سال های زیادی توانایی مشاهده تنوع ژنتیکی را بهبود دادند و به عنوان ابزاری استاندارد در مطالعات ژنتیکی ذخایر

ماهیان وحشی و پرورشی سابقه دارند، اما در سال های اخیر، نشانگرهای DNA به طور فزاینده ای جایگزین آنها شده اند. در اواخر قرن بیستم روش هایی جدید به منظور شناسایی، توصیف، اندازه گیری و تجزیه و تحلیل ژن ها توسعه یافتند. این روش ها حاصل کشف و بیان صحیح مدل پذیرفته شده و رایج ساختار DNA در اوایل دهه ۱۹۵۰ و ژنتیک مولکولی می باشند. امروزه مطالعه ساختار، عملکرد و دینامیک ژن ها در سطح مولکولی به عنوان یک شاخه قوی از ژنتیک مشخص شده است و نشانگرهای مولکولی زیادی برای مطالعه جنبه های مختلف جمعیت های وحشی، مولدین و برهم کنش متقابل بین ذخایر وحشی و پرورشی ماهیان و سایر آبزیان، موجود می باشند. این نشانگرهای مولکولی در تلفیق با پیشرفت های جدید آماری، تعیین تفاوت ها و شباهت های بین ذخایر و افراد را ممکن نموده اند (Okumuş and Çiftci, 2003). با استفاده از نشانگرهای ژنتیکی، مشاهده و بهره برداری از تنوع ژنتیکی در تمام ژنوم امکان پذیر است. فناوری نشانگرهای DNA، مسیر تحقیقات ژنتیک آبزیان را متحول نموده و آن را هدایت می کند. چندین نوع نشانگر در ژنتیک آبزیان تا اندازه زیادی معروفند. انواع نشانگرهایی که در این رشته جدیدترند شامل نشانگرهای:

(Restriction Fragment Length Polymorphism) RFLP،

(Random Amplified Polymorphic DNA) RAPD،

(Amplified Fragment Length polymorphism) AFLP،

و (Expressed Sequence Tags) ESTs

(Single Nucleotide Polymorphism) SNP می باشند (Liu and Cordes, 2004).

با استفاده از نشانگرهای DNA، پیشرفت سریع در بررسی تنوع ژنتیکی، درون آمیزی، شناسایی گونه و سویه و ایجاد نقشه های ژنتیکی در آبزیان امکان پذیر گردیده است (Liu and Cordes, 2004). تحولی که در علوم زیستی به نشانگرهای مولکولی نسبت داده می شود به دلایل ذیل می باشد:

۱- فراوانی فوق العاده این دسته از نشانگرها

۲- عدم تأثیرپذیری آنها از شرایط محیطی خارجی و داخلی موجود

۳- امکان به کارگیری آنها در مراحل نخستین رشد جنینی

۴- سهولت تشخیص افراد ناخالص از خالص

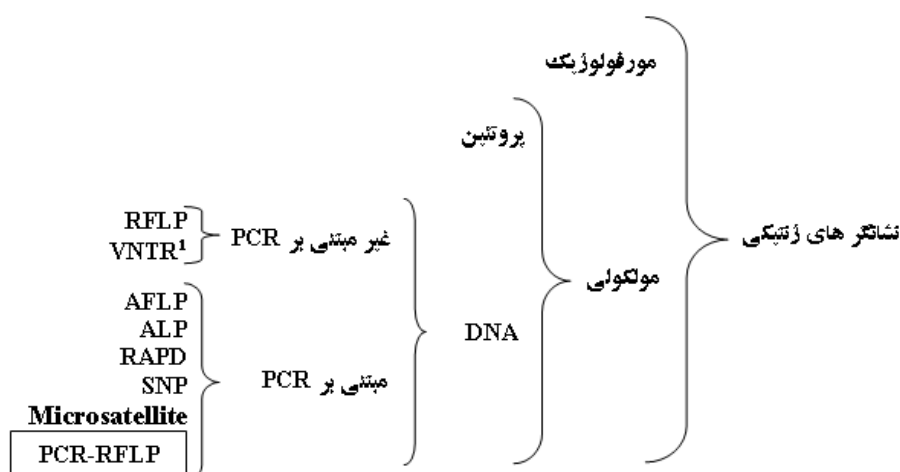
۵- دقت نتایج و قابلیت مطلوب و سهولت تجزیه و تحلیل و تفسیر آن

۶- دسترسی به برنامه های رایانه ای قوی برای تجزیه و تحلیل و تفسیر سریع نتایج (نقوی و همکاران،

۱۳۸۶).

### ۳-۱- طبقه بندی نشانگرهای ژنتیکی و جایگاه تحقیق

در طبقه بندی که در شکل ۱-۶ مشاهده می گردد، نشانگرهای ژنتیکی به دو گروه اصلی نشانگرهای مورفولوژیک و نشانگرهای مولکولی تقسیم می شوند. نشانگرهای مورفولوژیک دامنه وسیعی از ژن های کنترل کننده صفات فنوتیپی را شامل می شوند و نخستین نشانگرها به شمار می آیند که از زمان های دور، هنگامی که محل ژن ها بر روی کروموزوم مشخص شد، مورد استفاده قرار می گرفتند. همان طور که ملاحظه می گردد، نشانگرهای مولکولی نیز در دو گروه نشانگرهای پروتئینی و نشانگرهای DNA قرار می گیرند. اما نشانگرهای DNA در مدت یک دهه، تکاملی شگرف و تحسین برانگیز داشته اند. علاوه بر RFLP که هنوز هم از قدرتمندترین و معتبرترین نشانگرهای DNA می باشد، انواع مختلف نشانگرهای DNA با تفاوت های زیادی از نظر تکنیکی و روش تولید، نحوه کاربرد، امتیازبندی، تجزیه و



شکل ۱-۶- طبقه بندی انواع نشانگرهای ژنتیکی

تحلیل و تفسیر نتایج به سرعت ابداع و معرفی شدند. بی تردید ابداع و معرفی واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) بیشترین نقش را در توسعه و تکامل نشانگرهای DNA داشته است. به دلیل اهمیت و نقش مؤثر PCR در تحول و تکامل روز افزون فناوری نشانگرهای DNA، می توان این نشانگرها را به دو گروه کلی نشانگرهای DNA مبتنی بر کاربرد واکنش زنجیره ای پلیمرز و نشانگرهای DNA غیر مبتنی بر کاربرد این روش طبقه بندی نمود (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶). جایگاه این تحقیق در شکل ۱-۶ داخل کادر مشاهده می گردد.

آشنایی با انواع مختلف نشانگرها از نظر ویژگی های ذاتی آنها، کلید کاربرد موفقیت آمیز این ابزارهای مولکولی در ژنتیک جمعیت است (Koskinen, 2002). به طور کلی انتخاب بهترین نشانگر، به هدف مطالعه (ژنتیک جمعیت و روابط تکاملی، انگشت نگاری، ...) بستگی دارد (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

#### ۱-۴- ژنوم میتوکندری mtDNA

mtDNA در ۱۵ سال گذشته، توجه زیادی را در بسیاری گونه ها به ویژه در مورد مطالعات تکاملی و جمعیتی به خود معطوف داشته است (Avis, 1994; in: Okumuş and Çiftci, 2003). این امر موجب شده که mtDNA نشانگر بسیار معروفی گردد و برای بیش از یک دهه مطالعات ژنتیکی زیادی جهت پاسخگویی به سوالات فیلوژنی و ساختار جمعیتی در ماهیان با استفاده از این نشانگر طراحی گردد (Okumuş and Çiftci, 2003).

با استفاده از mtDNA سه نوع چند شکلی در ماهیان می تواند آشکار گردد که عبارتند از: چند شکلی های طولی، هتروپلاسمی<sup>۱</sup> و چند شکلی های محدود به جایگاه (restriction-site) که از طریق حذف یا اضافه شدن جفت باز و یا هر دو ایجاد می شوند (Dunham, 2004). یک مولکول میتوکندری معمولاً بین ۲ تا ۶ نسخه از mtDNA را می تواند دارا باشد. بنابراین تعداد mtDNA در یک سلول، ۱۰<sup>۸</sup> یا بیشتر می تواند باشد (Chang et al., 1994). تعداد مولکول های mtDNA

---

۱- هترو پلاسمی mtDNA، عبارت از وجود بیش از یک شکل (ژنوتیپ یا هاپلوئید) mtDNA در یک فرد می باشد.



در بافت های گوناگون متفاوت است. به عنوان مثال در سلول های لنفوسیت کم و در سلول های تخم فراوانند (Saccone et al., 1999).

ژنوم میتوکنندری از نظر بسیاری ویژگی ها شبیه به ژنوم باکتری ها است. این ژنوم به صورت DNA حلقوی فراپیچیده<sup>۱</sup> می باشد. اندازه ژنوم میتوکنندری در یوکاریوت های مختلف، متفاوت است. به طور کلی اندازه ژنوم میتوکنندری، محدوده وسیعی دارد و حدود ۱۶ تا ۲۰۰ Kbp (کیلو جفت باز<sup>۲</sup>) می باشد (امتیازی و کریمی، ۱۳۸۵). اندازه ژنوم میتوکنندری اکثر ماهی ها  $16500 \pm 500$  جفت باز می باشد (Billington and Hebert, 1991).

ویژگی های اصلی mtDNA و مزایای استفاده از آن در مطالعات تنوع ژنتیکی به قرار ذیل می باشند:

۱- بسیاری از محققین معتقدند mtDNA، یک مولکول هاپلوئید منفرد است که به طریق مادری به ارث می رسد و از این رو پدیده کراسینگ اور و نوترکیبی در آن صورت نمی گیرد (Okumuş and Çiftci, 2003; in: Billington, 2003). در این صورت تنوع ژنتیکی در mtDNA از طریق جهش روی می دهد. بیشتر تفاوت ها در توالی های mtDNA از نوع جهش نقطه ای می باشند (Gyllester et al., 1991 and et al., 1982; Brown).

۲- تمام ژن های mtDNA فاقد نواحی انترون می باشند (Okumuş and Çiftci, 2003; in: Billington, 2003).

۳- میزان تکامل mtDNA خیلی سریع تر از DNA هسته می باشد به طوری که سرعت جایگزینی نوکلئوتیدها در mtDNA مهره داران عالی تقریباً ۵ تا ۱۰ برابر بیشتر از ژنوم هسته است (Brown et al., 1979; Upholt and Dawid, 1977). بنابراین mtDNA شامل تنوع بیشتری در توالی بازهای آلی است که در نتیجه تشخیص گونه های کاملاً وابسته را امکان پذیر می نماید (Zhang et al., 2006; in: Vawter and Brown, 1986; Donaldson and Wilson, 1999; Farias et al., 2001).

۴- ژنوم میتوکنندری از نظر ساختاری و عملکرد، ساده تر از ژنوم هسته می باشد (Mabuchi et al., 2005).

---

1- supercoil

2- Kilo base pair

۵- DNA میتوکندری در مقایسه با DNA هسته، نسبت به تغییرات در وفور ژنی یا آللی یک جمعیت، تقریباً ۴ برابر حساس تر است و از این رو تمایزهای ژنتیکی را بهتر نشان می دهد (Hiltsdorf et al., 2002).

۶- ژنوم میتوکندری برهم کنش شناخته شده ای با محیط ندارد به طوری که به نظر می رسد تنوعات ژنتیکی بین افراد حقیقتاً بازتابی از وجود جدایی تولید مثلی باشد (Mabuchi et al., 2005).

۷- مطالعه انواع مهره داران نشان داده که معمولاً میزان تغییرات در mtDNA سریعتر از DNA هسته می باشد (Brown, 1985; in: Liu and Cordes, 2004). این موضوع نشان دهنده میزان سریع تر جهش در mtDNA نسبت به DNA هسته می باشد که ممکن است به دلیل فقدان بازسازی اشتباهات در مکانیسم های همانندسازی (Wilson et al., 1985; in: Liu and Cordes, 2004) و نیز تأثیر کمتر اندازه جمعیت به دلیل وراثت پذیری اکیداً مادری ژنوم هاپلوئید mtDNA باشد (Birky et al., 1989; in: Liu and Cordes, 2004).

اما برای mtDNA محدودیت هایی نیز متصور است. تحلیل های mtDNA دلیل قاطعی برای وجود جدایی تولید مثلی درون یا بین جمعیت ها فراهم نمی کند (Ovenden and Brasher, 1994). به علاوه اطلاعاتی که از بررسی mtDNA به دست می آیند، فقط مربوط به یک جایگاه ژنی<sup>۱</sup> منفرد می باشند. بنابراین فقط از یک پنجره منفرد به تکامل می نگریم که در بهترین حالت، فقط تاریخچه جد مادری را انعکاس می دهد (Magoulas, 1998; in: Okumus and Çiftci, 2003). بنا بر این استنتاج، ما در انجام مطالعات، دچار جانبداری<sup>۲</sup> خواهیم شد و از این رو نیاز به نشانگرهای مولکولی ژنومیک مستقل، جهت حمایت از آنالیزهای mtDNA روشن است (Okumus and Çiftci, 2003).

نشانگرهای میتوکندریایی در میان متخصصین ژنتیک آبزیان کاملاً معروفند (Benzie et al., 2002). آنالیز نشانگرهای mtDNA در ماهیان زیادی از جمله مارماهیان (Avisé et al., 1986)، blue fish (Graves et al., 1992)، rde drum (Gold et al., 1993)، Snappers (Chow et al., 1993) و کوسه ماهیان (Heist and Gold, 1999) در سطح وسیعی استفاده شده است (Liu and Cordes, 2004).

1- Locus

2- Bias

تنوع در mtDNA اساساً با دو دیدگاه مختلف مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار می گیرد:

۱- تمام mtDNA به دست آمده از بافت ماهی خالص سازی شده، تحت آنالیز RFLP از طریق هضم با اندونوکلازهای برشی قرار گیرد (Billington, 2003; in: Okumuş and Çiftci, 2003) که در این حالت مقدار زیادی mtDNA مورد نیاز می باشد که ممکن است تهیه آن در مورد آبزیان کوچک، منجر به مرگ آنها شود (Ferguson et al., 1995).

۲- قطعات کوچکی از مولکول mtDNA که از طریق تکثیر توسط واکنش زنجیره ای پلیمرز تهیه شده اند تحت آنالیز RFLP قرار گیرند (Billington, 2003; in: Okumuş and Çiftci, 2003) که به PCR-RFLP معروف است.

#### ۱-۵- واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) Polymerase Chain Reaction

واکنش زنجیره ای پلی مرز که معمولاً به طور اختصار PCR خوانده می شود، فرآیندی بسیار قوی است که تکثیر ردیف منتخبی از مولکول یک ژنوم را تا چندین میلیون برابر در کمتر از نیم روز امکان پذیر می کند. اما این فرآیند هنگامی امکان پذیر است که حداقل توالی کوتاهی (معمولاً به طول ۲۰ نوکلئوتید) از دو انتهای قطعه DNA مورد نظر به عنوان پرایمر<sup>۱</sup> (آغازگر) معلوم باشد. در این فرآیند که تقلیدی از فرآیند همانندسازی DNA در طبیعت است، ساخت DNA با استفاده از اولیگونوکلئوتیدهای صناعی (پرایمر یا آغازگر) انجام می شود که مکمل توالی شناخته شده دو انتهای قطعه مورد نظر DNA می باشند (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶). از آنجا که DNA دو رشته ای است، دو پرایمر در PCR مورد نیاز است. این دو پرایمر، دو عمل انجام می دهند (امتیازی و کریمی، ۱۳۸۵). اول این که تعیین کننده جایگاه های شروع پلیمریزه کردن DNA توسط DNA پلی مرز می باشند و ناحیه مورد نظر از DNA الگو (محل ژن مورد نظر) که باید تکثیر شود را مشخص می نمایند (Mullis and faloona, 1986; in: Mcpherson and mØuler, 2006) و دوم این که اندازه قطعات تکثیر شونده را تعیین می کنند (امتیازی و کریمی، ۱۳۸۵). این همانندسازی که طی

---

1- Primer

واکنش زنجیره ای پلیمراز انجام می گردد، فرآیندی آنزیمی است و توسط انواع مختلفی از آنزیم های پلی مرز مقاوم به حرارت صورت می گیرد (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶). آنزیم DNA پلی مرز در هنگام ساخت DNA، نوکلئوتید صحیح را برای اضافه کردن به پرایمر انتخاب می کند تا طول رشته DNA را بر اساس قانون جفت شدن بازهای واتسون- کریک (A:T , G:C) اضافه نماید (Mcpherson and mØuler, 2006). این واکنش از آن روی ارزشمند است که عمل آن بسیار اختصاصی و به سادگی ماشینی شده که قادر است عمل تکثیر را از مقادیر فوق العاده کم DNA الگو، آغاز نماید (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

**مواد مورد نیاز برای انجام واکنش زنجیره ای پلی مرز عبارتند از:** DNA الگو، نوکلئوتیدها یا dNTP، DNA پلی مرز، منیزیم  $Mg^{+2}$ ، Tris-HCl و یا بافرهای استاندارد PCR، KCl، پرایمرها (آغازگرهای اولیگونوکلئوتیدی).

۱- **DNA الگو:** DNA الگو را بسته به نوع آزمایش، می توان بر اساس دستورالعمل های موجود استخراج نمود. به طور کلی مقدار DNA الگو مورد نیاز برای PCR معمولاً تا یک میکروگرم از DNA ژنومی می باشد (Mcpherson and mØuler, 2006).

۲- **نوکلئوتیدها یا dNTP:** محلول های آماده dNTP با غلظت ۱۰۰ تا ۳۰۰ mM از بسیاری منابع تجاری قابل خریداری می باشند. نکته مهم در موفقیت PCR آن است که هر چهار dNTP غلظت های یکسانی داشته باشند، در غیر این صورت دقت PCR کاهش خواهد یافت (Mcpherson and mØuler, 2006).

۳- **DNA پلی مرز:** یک آنزیم DNA پلی مرز مقاوم به حرارت مانند DNA پلی مرز Taq مناسب ترین آنزیم برای انجام PCR است. پایداری DNA پلی مرز Taq در دماهای بالای مورد استفاده در PCR، امکان تکرار چرخه های تکثیر DNA را پس از فقط یک بار اضافه کردن آنزیم در زمان شروع واکنش فراهم می نماید. دمای بهینه فعالیت این آنزیم برای ساخت DNA، ۷۲ تا ۷۵ درجه سانتی گراد است. این آنزیم در دماهای بالای مراحل اتصال پرایمرها قابل استفاده است که این مزیت، اتصال اختصاصی پرایمرها را بهبود می دهد و باعث تکثیر توالی هدف می گردد (Mcpherson and mØuler, 2006).

۴- منیزیم  $Mg^{+2}$ : منیزیم یکی از اساسی ترین مواد در PCR می باشد، زیرا غلظت آن بر دقت و بازده واکنش تأثیرگذار است. DNA پلی مراز Taq به وجود منیزیم وابسته است و بیشترین فعالیت خود را در حضور  $Mg^{+2}$  آزاد به مقدار ۱/۲ تا ۱/۳ mM نشان می دهد (Mcpherson and mØuler, 2006).

۵- Tris-HCl<sup>۱</sup> و یا بافرهای استاندارد PCR: Tris-HCl یک بافر یونی دو قطبی است که pH آن با دما تغییر می کند و در واکنش زنجیره ای پلیمراز، pH آن بین ۶/۸ و ۸/۸ متغیر می باشد. در واقع DNA پلی مراز Taq در مقادیر کمتر pH، صحت عمل بیشتری خواهد داشت که این pH در دماهای بالاتر PCR ایجاد می شود (Eckert and Kunkel, 1995; in: Mcpherson and mØuler, 2006).

۶- KCl: KCl می تواند به اتصال پرایمر به DNA الگو کمک کند. اما غلظت های زیاد KCl می تواند از طریق پایدار کردن اتصال نادرست پرایمرها به جایگاه های غیر هدف، باعث تولید محصولات ناخواسته گردد (Mcpherson and mØuler, 2006).

۷- پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی (آغازگرها): اولیگونوکلئوتیدها به صورت گسترده در دسترسند و شرکت های زیادی وجود دارند که با پرداخت هزینه کم، ساخت و خالص سازی پرایمرهای مورد نیاز را در چند روز انجام می دهند (Mcpherson and mØuler, 2006).

مهم ترین ویژگی PCR، توانایی آن در تکثیر یک ناحیه مشخص از یک الگوی اولیه بسیار پیچیده مانند DNA ژنومی است. به همین دلیل لازم است وقایعی که در حین PCR و تکثیر یک DNA الگو روی می دهد را بشکافیم تا فرآیند واکنش بهتر درک گردد (Mcpherson and mØuler, 2006).

مبنای واکنش زنجیره ای پلی مراز، استفاده از دماهای مختلف در سه مرحله واکنش شامل واسرشته سازی Denaturation، اتصال Annealing و طویل شدن یا توسعه Extension به شرح ذیل می باشد (Mcpherson and mØuler, 2006).

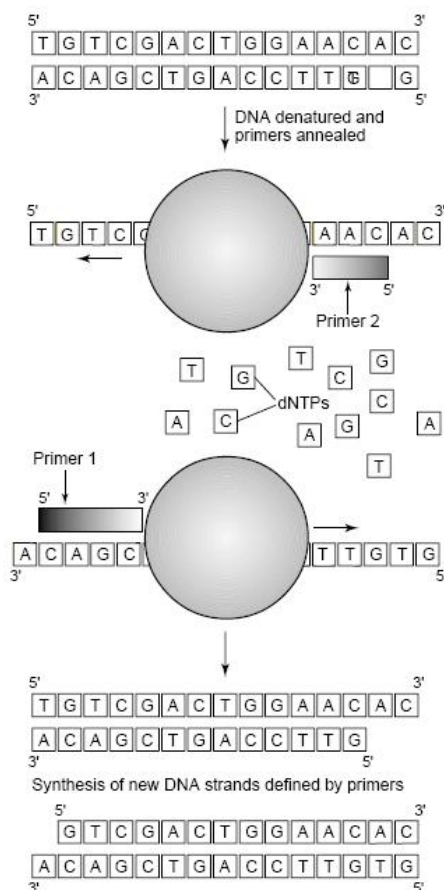
۱- مرحله واسرشته سازی DNA الگو (Denaturing): در این مرحله، DNA الگو در دماهای ۹۳ تا ۹۴ درجه سانتی گراد واسرشته شده و رشته های مکمل از یکدیگر جدا می شوند (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

---

۱- هیدروکسی اتیل آمینو اتیل هیدروکلراید (امتیازی و کریمی، ۱۳۸۵)

۲- **مرحله اتصال پرایمرها:** در این مرحله، دما بسته به پرایمرهای مورد استفاده، تا رسیدن به دمای اتصال پرایمرها به توالی های مکمل خود بر روی رشته های DNA الگو یعنی ۴۰ تا ۷۲ درجه سانتی گراد کاهش می یابد (Mcpherson and møuler, 2006).

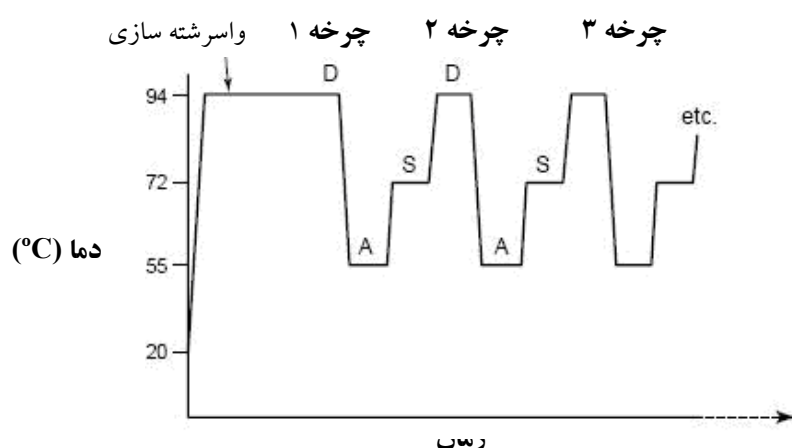
۳- **مرحله طویل شدن یا توسعه پرایمرها:** سرانجام در مرحله سوم، برای ساخت DNA با کارآیی زیاد، دمای بهینه که معمولاً ۷۲ درجه سانتی گراد است، برای فعالیت بسیاری از DNA پلی مرازهای مقاوم به حرارت منظور می شود. DNA پلی مراز به محض اتصال پرایمرها به DNA الگو، افزایش طول آنها را آغاز خواهد کرد. ساخته شدن DNA جدید از طریق افزوده شدن نوکلئوتیدها به انتهای پرایمرها بر مبنای رشته DNA الگو و پلیمریزه شدن نوکلئوتیدها امکان پذیر می شود (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶). پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی توسط DNA پلی مراز و در حضور چهار داکسی نوکلئوتید (dTTP, dCTP, dGTP, dATP) افزایش طول می یابند و در نتیجه ناحیه DNA الگو مابین دو پرایمر، در هر چرخه PCR تکثیر می گردد. شکل ۱-۷، یک مولکول دو رشته ای الگو را نشان می دهد که واسرشته شده و تک رشته ای می شود. آنگاه هر پرایمر



شکل ۱-۷- چرخه اول از یک واکنش زنجیره ای پلی مراز

به توالی مکمل خود در الگوی تک رشته ای اتصال می یابد و سپس ساخت DNA به وسیله یک DNA پلی مراز مقاوم به دما انجام می شود. حاصل این چرخه، یک نسخه کپی از توالی هدف در هر رشته اصلی می باشد (Mcpherson and møuler, 2006).

به منظور تکثیر DNA هدف، لازم است سه مرحله فوق، بسته به آزمایش و کاربرد مورد نظر، ۲۵ تا ۴۰ بار تکرار شوند (شکل ۸-۱) (Mcpherson and møuler, 2006). همان طور که در شکل مشاهده می گردد، دمای واکنش در مرحله واسرشته سازی چرخه اول، از دمای اتاق به دمای شروع واسرشته سازی یعنی ۹۴ درجه سانتی گراد افزایش می یابد و برای اطمینان از تک رشته ای شدن DNA، مدت ۵ دقیقه در این دما باقی می ماند و سپس چرخه های دمایی تکراری را خواهیم داشت (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).



شکل ۸-۱- نمایش تغییرات دمایی در واکنش زنجیره ای پلی مراز

(D) واسرشته سازی مولکول های دو رشته ای DNA

(A) اتصال پرایمرها به الگو

(S) طولیل شدن پرایمرها و ساخت DNA

به این ترتیب در اولین چرخه PCR (شامل سه مرحله واسرشته سازی، اتصال و طولیل شدن پرایمر)، هر رشته DNA الگو، یک دو رشته ای جدید ایجاد می کند و تعداد نسخه های ناحیه هدف دو برابر می شود. بنابراین بعد از یک چرخه، رشته های الگوی اولیه و دو رشته جدید حاصل می گردد که بسیار کوتاه تر از رشته اولیه، ولی طولیل تر از قطعه هدف می باشند. در ابتدای هر رشته جدید نیز توالی مربوط به پرایمرها

قرار دارد. در چرخه دوم، پرایمرها مجدداً به الگوهای اولیه متصل خواهند شد، ولی به رشته‌های ساخته شده در چرخه اول نیز متصل می‌شوند. بنابراین در انتهای چرخه دوم علاوه بر رشته‌های با طول نامشخص، رشته‌هایی نیز تولید می‌گردند که دقیقاً محدود به دو پرایمر و محصول مورد انتظار می‌باشند. این رشته‌های دارای طول مشخص در چرخه‌های بعدی تکثیر می‌شوند و باعث ازدیاد تصاعدی قطعه هدف می‌گردند (Mcpherson and møuler, 2006).

تکثیر تصاعدی محصول PCR مطابق فرمول زیر انجام می‌گردد:

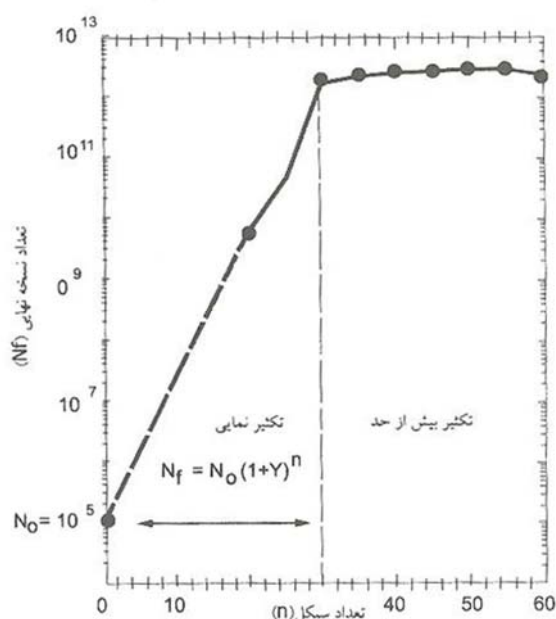
$$N_f = N_0 (1 + Y)^n$$

که در آن:

$N_f$ : تعداد کپی نهایی توالی هدف دو رشته‌ای  $Y$ : کارآیی توسعه پرایمر در هر چرخه

$N_0$ : تعداد کپی اولیه  $n$ : تعداد چرخه PCR در تکثیر تصاعدی

در بیشتر حالت‌ها، وقتی تعداد کپی نهایی ( $N_f$ ) قطعه مورد نظر به حدود  $10^{12}$  می‌رسد، کارآیی آن در هر چرخه ( $Y$ ) کاهش می‌یابد و در نتیجه تکثیر تصاعدی متوقف می‌شود (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶). افزایش تعداد چرخه در PCR بیش از این مقدار، به دلایل مختلف از جمله اتصال رشته‌های محصول به یکدیگر موجب تکثیر غیر اختصاصی خواهد شد (Jones, 2003; in: Theophilus and Rapley, 2003) (شکل ۹-۱).



شکل ۹-۱- رابطه بین تعداد کپی نهایی توالی هدف با تعداد چرخه PCR



به کمک معادله فوق و با آگاهی از تعداد کپی های اولیه، این امکان وجود دارد که تعداد چرخه مورد نیاز برای به دست آوردن تعداد  $10^{12}$  کپی را محاسبه کرد. برای مثال به کمک آنزیم پلی مراز Taq (با فرض کارایی ۷۰ درصد) و با استفاده از ۱ میکروگرم DNA ژنومی (در ژنوم پستانداران معادل  $3 \times 10^5$  کپی موجود است)

$$10^{12} = 3 \times 10^5 (1 + 0.7)^n \rightarrow n \approx 28/6 \quad \text{خواهیم داشت:}$$

بنابراین در این حالت، تکثیر تصاعدی، تا حدود ۲۹ چرخه وجود خواهد داشت (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

در صورت کارایی ۱۰۰ درصد واکنش زنجیره ای پلی مراز، تنها پس از ۲۰ چرخه، یک میلیون نسخه از DNA هدف تکثیر خواهد شد ( $2^{20} = 1/0.48/572$ ). البته کارایی واکنش به دلایل مختلف هیچگاه ۱۰۰ درصد نمی گردد، اما معمولاً با افزایش تعداد چرخه ها (اغلب ۲۵ تا ۴۰ چرخه مورد نیاز است) و بهینه نمودن شرایط تکثیر، تعداد  $10^6$  نسخه از DNA هدف حاصل می گردد. کارایی PCR معمولاً ۶۰ تا ۸۰ درصد می باشد (Mcpherson and mØuler, 2006).

امروزه PCR یک واکنش تکنیکی ساده است که در آن، مواد مورد نیاز برای انجام PCR، درون میکروتیوب های ۰/۲ یا ۰/۵ میلی لیتری از جنس پلی پروپیلن مخلوط شده سپس تیوب ها داخل پلت های ویژه ترموسایکلر قرار داده می شوند و دماهای چرخه های واکنش بر اساس دستورات برنامه ریزی شده به طور اتوماتیک بر آنها اعمال می گردد (Mcpherson and mØuler, 2006).

## ۱-۶- الکتروفورز ژل آگارز

پس از اتمام PCR، به منظور بررسی میزان موفقیت واکنش و یا بررسی محصول PCR، با توجه به هدف آزمایش، یکی از انواع روش هایی انتخاب می گردد که برای بررسی محصول PCR موجود می باشند. متداول ترین، ساده ترین و سریع ترین روش، الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز است.

آگارز یک پلی مر خطی است که از نوعی جلبک استخراج می شود و هنگامی که در یک بافر (معمولاً بافر TBE)<sup>۱</sup> حرارت داده شده و سپس سرد گردد، به وسیله پیوندهای هیدروژنی تشکیل ژل می دهد.

---

1- Tris- borate

امروزه انواع شیمیایی آگارز به صورت تجاری موجود می باشد. الکتروفورز ژل آگارز، روشی استاندارد برای تفکیک و تعیین کمیت و کیفیت قطعات DNA بر اساس اندازه یا وزن مولکولی در ژل آگارز می باشد که برای انجام آن از دستگاه الکتروفورز استفاده می شود. اساس کار این دستگاه بر پایه قرار گرفتن ذرات باردار در مسیر عبور جریان الکتریکی می باشد. در این مسیر، ذرات دارای بار منفی به سوی قطب مثبت و ذرات دارای بار مثبت به سوی قطب منفی حرکت می کنند. در الکتروفورز Total DNA روی ژل آگارز، DNA و RNA به دلیل دارا بودن یون های فسفات، دارای بار منفی زیادی می باشند و به همین دلیل به طرف قطب مثبت حرکت می کنند و قطعات مختلف DNA در طول مسیر، بر حسب وزن مولکولی که دارند از یکدیگر جدا می شوند. از آنجا که سرعت حرکت قطعات سبک تر بیشتر از قطعات سنگین تر است، لذا قطعات مختلف DNA از هم جدا شده و باندهای مختلفی را در ژل تشکیل می دهند. با استفاده از قطعات شاهد با وزن مولکولی مشخص می توان وزن مولکولی قطعات مجهول را معین نمود (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶؛ امتیازی و کریمی، ۱۳۸۵؛ امیدی و عالیشاه، ۱۳۸۵).

در این روش، موفقیت یا شکست واکنش با بررسی چند عامل مشخص می گردد: آیا تک باند مربوط به محصول وجود دارد؟ آیا اندازه مورد انتظار را دارد؟ آیا چندین باند وجود دارد و باند اصلی، باند مورد انتظار است؟ (Mcpherson and mØuler, 2006; Guilliatt, 2003; in: Theophilus and Rapley, 2003).

به منظور کمک به قرار گرفتن نمونه درون ژل و نیز مشاهده حرکت نمونه در ژل، مقداری بافر سنگین کننده<sup>۱</sup> حاوی گلیسرول و یک رنگ شاخص مانند بروموفنل بلو به نمونه اضافه می شود. شاخص های مولکولی مناسب مثلاً شاخص های ۱۰۰ یا ۱۰۰۰ جفت بازی که توسط شرکت های مختلف تولید می شوند و قابل خریداری هستند، در چاهک کناری ژل قرار داده می شوند. قطعات تکثیر شده پس از تفکیک در ژل، زیر نور ماوراءبنفش قابل مشاهده می باشند و به منظور ثبت نتایج، ژل توسط دستگاه تصویربرداری دیجیتال قابل عکس برداری است. در بیشتر موارد، یک ژل آگارز ۱ درصد، تفکیک قطعات DNA با اندازه ۵۰۰ تا ۴۰۰۰ جفت باز را با وضوح کافی انجام می دهد. به منظور تفکیک قطعات

---

1- Loading buffer

بسیار کوچک، استفاده از آگارزهای خاص مانند Metaphor® در غلظت ۳/۵ درصد که قدرت تفکیک قطعات ۱۰ تا ۱۰۰۰ جفت بازی را دارند ارجحیت دارد (Mcpherson and mØuler, 2006)

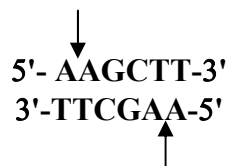
#### ۱-۷- الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید

الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید اولین بار در سال ۱۹۵۹ به عنوان روشی برای جداسازی پروتئین ها معرفی شد و سپس برای تفکیک اسیدهای نوکلئیک به کار رفت. اندازه منافذ ژل، بسته به درصد پلی اکریل آمید به کار رفته در تهیه آن (از ۳ تا ۳۰ درصد) برای جداسازی مولکول های با اندازه های مختلف به کار می رود (هاشمی و همکاران، ۱۳۸۹). ژل های پلی اکریل آمید در مورد محصولات بسیار کوچک و به عبارت دیگر برای تشخیص قطعات با تفاوت های ناچیز اندازه در محصول PCR، بهترین سیستم جداسازی می باشند (Mcpherson and mØuler, 2006). ژل پلی اکریل آمید قادر به تفکیک مولکول های DNA با طول کم تر از ۱۰۰۰ جفت باز می باشد (هاشمی و همکاران، ۱۳۸۹).

#### ۱-۸- چند شکلی طولی قطعات محدود (RFLP)<sup>۱</sup> و آنزیم های برش دهنده (نشاتگر مولکولی PCR-RFLP)

همان طور که گفته شد تغییرات توالی DNA در یک ژن، نتیجه پلی مورفیسم یا جهش می باشد. ژنوم موجودات به طور طبیعی دارای تفاوت هایی در توالی بازهای تشکیل دهنده می باشند. این تفاوت های طبیعی که سبب گوناگونی در افراد یک جمعیت می شوند، پلی مورفیسم نام دارند. بعضی از پلی مورفیسم هایی که با فراوانی زیاد در یک جمعیت روی می دهند، می توانند ابزار مفیدی برای ردیابی ژن مورد نظر باشند. چنانچه پلی مورفیسم در محل عملکرد آنزیم برشی ایجاد گردد، با استفاده از RFLP که یکی از روش های شناسایی جایگزینی های نوکلئوتیدی می باشد، به راحتی قابل ردیابی است (Theophilus and Rapley, 2003). (Enayat, 2003; in:

در حقیقت RFLP در پی کشف آنزیم های برش دهنده (برشی) پدید آمد. آنزیم های برشی، آنزیم های بسیار اختصاصی می باشند (امتیازی و کریمی، ۱۳۸۵) که توالی های نوکلئوتیدی خاصی از DNA دو رشته ای به طول ۴، ۵ یا ۶ جفت باز را شناسایی می کنند و آنها را در یک نقطه برش می دهند که ممکن است در داخل یا خارج توالی مورد شناسایی باشند. قطعات حاصل از برش، باعث ایجاد تفاوت در الگوهای ایجاد شده در جریان الکتروفورز می گردند (Liu and Cordes, 2004؛ نقوی و همکاران، ۱۳۸۶). یکی از مهم ترین خصوصیات این توالی های ۴ تا ۸ جفت بازی این است که غالباً به صورت قرینه و یا اصطلاحاً پالیندروم<sup>۱</sup> می باشند. پالیندروم در زبان یونانی به معنی کلمه یا عبارتی است که اگر از سمت راست به چپ یا از چپ به راست خوانده شود، معنی یکسانی دارد مانند eye یا رادار (امتیازی، ۱۳۸۶). به عنوان مثال آندونوکلئاز *HindIII* (نامگذاری آنزیم، بر پایه ارگانسمی انجام شده که آنزیم از آن جدا می شود)، DNA را در محل پیکان ها طوری برش می دهد که توالی ۶ نوکلئوتیدی روبرو:



قطعاتی به شکل زیر بوجود می آورد:

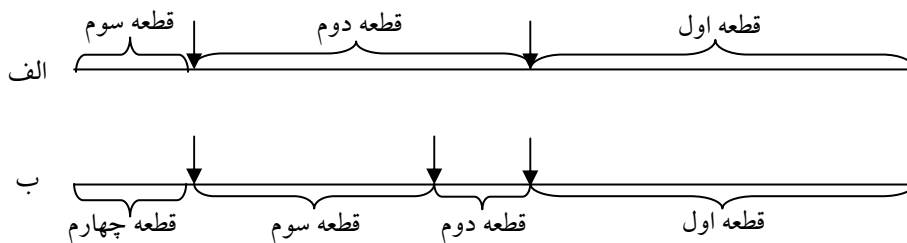
(فرازمند و همکاران، ۱۳۸۵).

شکل ۱-۱۰ مبنای RFLP را نشان می دهد. در این شکل، رشته های الف و ب، دو رشته DNA مشابه می باشند که از دو فرد متعلق به یک گونه به دست آمده اند. پیکان ها نیز محل برش توسط یک آنزیم برشی می باشند. به طوری که مشاهده می شود، این آنزیم دارای دو ناحیه برش در DNA فرد الف و سه ناحیه برش در DNA فرد ب می باشد که به ترتیب به ایجاد ۳ و ۴ قطعه DNA با اندازه های مختلف منجر گردیده است. تفاوتی که در بین طول قطعات DNA دو فرد الف و ب مشاهده می شود، همان تفاوت طول قطعات حاصل از هضم (RFLP) می باشد. نخستین پرسشی که مطرح می شود این است که علت این تفاوت در تعداد

---

1- Palindrome

محل هضم چیست؟ پاسخ، ایجاد یا حذف یک نقطهٔ برش در قطعهٔ دوم است که می‌تواند در نتیجهٔ یک جهش نقطه‌ای پدید آمده باشد.



شکل ۱-۱۰- مبنای RFLP در مولکول DNA دو فرد الف و ب

بنابراین RFLP شامل برش DNA توسط آنزیم‌های برشی به قطعات کوچک‌تر با اندازه معین و تفکیک آنها بر اساس وزن مولکولی در یک میدان الکتریکی می‌باشد و یکی از نشانگرهای مولکولی است که اساس ژنتیک مولکولی را تشکیل می‌دهد (فرازمند و همکاران ۱۳۸۵). به عبارت دیگر، RFLP عبارت است از وجود چند شکلی در یک فرد که از طریق تفاوت در اندازه‌های قطعات با طول معین و محدود به دست آمده توسط یک اندونوکلاز برشی مشخص می‌شود (Okumus and ciftci, 2003). چنانچه یک آنزیم برشی در قطعه‌ای از DNA دو فرد از یک گونه، تعداد مشابهی برش ایجاد کند، نشان دهنده آن است که آن قطعه DNA در هر دو فرد، جایگاه برشی مشابهی برای آن آنزیم دارد. اما گاهی یک آنزیم برشی برش‌های متفاوت از نظر اندازه و تعداد در DNA دو فرد از یک گونه ایجاد می‌کند که از طریق شمارش و اندازه‌گیری تعداد قطعات DNA پس از الکتروفورز آشکار می‌گردد (هر تیپ از DNA آشکار شده در میان افراد، به یک هاپلو تیپ موسوم است) (Ovenden, 1990).

در PCR-RFLP، به همراه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و پس از تکثیر قطعه ژنوم حاوی پلی‌مورفیسم مورد استفاده قرار می‌گیرد (فرازمند و همکاران، ۱۳۸۵). PCR-RFLP علاوه بر کاربرد در تجزیه و تحلیل جمعیتی می‌تواند در مطالعات سیستماتیک و شناسایی گونه‌ها نیز بسیار مفید باشد (یزدی صمدی و ولیزاده، ۱۳۸۰). کاربرد RFLP در شناسایی بین گونه‌ای ماهیان منقاردار Bill fish

(Chow, 1994 ; Innes et al., 1998)، Snappers (Chow et al., 1993) و انواع شوریده ماهیان (1994)

(Daniel and Graves, 2001) ثابت شده است (Cordes et al., 2001).

در مطالعات انجام شده، تنوع ژنتیکی ژنوم میتوکندریایی به دلیل مزایای نشانگر مولکولی PCR-RFLP به شرح ذیل، بر مبنای RFLP قطعات کوچکی از mtDNA با استفاده از PCR مورد بررسی قرار گرفته است.

۱- وراثت پذیری مادری و اندازه نسبتاً کوچک mtDNA، آنالیز RFLP این مولکول را یکی از

روش های منتخب برای بسیاری از مطالعات جمعیتی می نماید (Ferguson et al., 1995).

۲- پرایمرهای جهانی PCR که نواحی معینی از ژنوم میتوکندریایی را به کار می برند، در مورد

دامنه وسیعی از گونه ها به آسانی در مقالات قابل دستیابی می باشند (Cordes et al., 2001).

۳- سریع و ارزان است و تجهیزاتی که نیاز دارد در بیشتر آزمایشگاه های مولکولی موجود می باشد

(Cordes et al., 2001).

۴- دقت و قابلیت اعتماد بسیار زیادی دارد (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

۵- هم بارز است و امکان تشخیص هر یک از انواع افراد خالص را از افراد ناخالص فراهم می کند

(Hall, 1999)، زیرا آلل های یک جایگاه ژنی توسط نشانگر هم بارز به طور همزمان در یک فرد

تظاهر می یابند (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

۶- ابزاری با قدرت فراوانی زیاد در شناسایی تنوع به شمار می آید. به این معنا که در این روش، تعداد

زیادی جایگاه برشی اندونوکلئازی در ژنوم وجود دارد (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

۷- استفاده از این نشانگر، شناسایی چند شکلی ها در هر جایگاه از ژنوم و در هر مرحله از رشد موجود را

امکان پذیر می نماید (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

۸- صد در صد ژنتیکی است و تحت تأثیر عوامل محیطی داخلی و خارجی نمی باشد (نقوی و همکاران،

۱۳۸۶).

۹- امروزه تعداد زیادی آنزیم برشی با قیمت مناسب در دسترس است که امکان شناسایی چند شکلی ها را

در ژنوم افزایش می دهند (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

اگرچه نشانگرهای RFLP در بسیاری موارد مفیدند، اما معایبی نیز دارند از جمله آن که وقت گیرند و نیز این که RFLP ژنوم های بزرگ نیازمند کاربرد مواد پرتوزا یا روش های پیچیده تر و گران تر بیوشیمیایی می باشد ( نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

جهت انجام واکنش های هضم آنزیمی (RFLP)، محلول حاوی محصول واکنش PCR، آنزیم برش دهنده، بافر مخصوص هر آنزیم و آب مقطر دو بار تقطیر، درون میکروتیوب های ۰/۵ میلی لیتری به طور کامل مخلوط می شوند. سپس در دمای بهینه فعالیت هر آنزیم، به مدت یک یا دو ساعت در بن ماری قرار داده شده و نتیجه عمل آنزیم ها بسته به اندازه قطعات، روی ژل آگارز ۲ الی ۳ درصد و یا ژل پلی اکریل آمید مشاهده می شود.

#### ۱-۹- پیشینه مطالعات مولکولی انجام شده در آبزیان

##### ۱-۹-۱- پیشینه مطالعات مولکولی انجام شده در ماهی سوکلا

در مطالعه ای که توسط Pruett و همکاران در سال ۲۰۰۴ انجام گردید، ژنتیک جمعیت ماهی سوکلا در سواحل جنوب شرقی ایالات متحده با استفاده از روش ریز ماهواره مورد بررسی قرار گرفت. آنها با استفاده از ۲۰ آغازگر ریز ماهواره در ۲۴ عدد نمونه ماهی، دامنه تنوع ژنتیکی (هتروزیگوسیتی) را بین صفر تا ۰/۹۱۰ گزارش نمودند.

Renshaw و همکاران در سال ۲۰۰۵، تنوع ژنتیکی ماهی سوکلا در سواحل میسی سیپی را با استفاده از ۳۵ آغازگر ریز ماهواره در ۲۴ عدد نمونه ماهی سوکلا مورد مطالعه قرار دادند و در ۳۳ ریز ماهواره، چندشکلی مشاهده نمودند. اما تنوع ژنتیکی (هتروزیگوسیتی) به طور متوسط از مقادیر گزارش شده برای سایر ماهیان دریایی کمتر بود.

Liu و همکاران در سال ۲۰۰۵، تنوع ژنتیکی جمعیت های طبیعی ماهی سوکلا در آب های سرزمینی کشور چین را با استفاده از دو روش RAPD و RFLP مورد بررسی قرار دادند. آنها در روش RAPD از ۱۷ آغازگر و در روش RFLP از ۱۹ آنزیم برشی و ژن سیتوکروم b در mtDNA استفاده نمودند. در این

بررسی، تنوع ژنتیکی نسبتاً بالا بود، به طوری که در ۸۰/۸۵ درصد از جایگاه های ژن مورد بررسی چندشکلی مشاهده گردید و فاصله ژنتیکی بین نمونه ها ۰/۲۶۰ به دست آمد.

سالاری علی آبادی و همکاران در سال ۱۳۸۷ جمعیت های ماهی سوکلای خلیج فارس و دریای عمان را با استفاده از روش ریز ماهواره و ۱۰ جفت آغازگر مورد مقایسه ژنتیکی قرار دادند. نتایج حاصل از مشاهدات آنها نشان داد که ماهی سوکلا در خلیج فارس و دریای عمان دارای سه جمعیت مجزا می باشد.

#### ۱-۹-۲- پیشینه مطالعات مولکولی انجام شده به روش PCR-RFLP در آبزیان ایران

در بررسی تنوع ژنتیکی در تاسماهی ایرانی *Acipenser persicus* در رودخانه سفید رود و جنوب شرقی و غربی دریای خزر که توسط عطایی و همکاران در سال ۱۳۸۱ و با استفاده از روش PCR-PFLP انجام گردید، ناحیه D-loop در mtDNA با روش PCR تکثیر شد و ۲۴ آنزیم برشی مورد استفاده قرار گرفت. در این بررسی، توزیع هاپلوتیپ ها بین سه منطقه مورد مطالعه، تفاوت معنی داری را نشان نداد.

در بررسی ژنتیک جمعیت ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio* در حوزه جنوبی دریای خزر به روش PCR-RFLP و با استفاده از mtDNA (دو ژن ND-3/4 و ND-5/6) که توسط لالویی و همکاران در سال ۱۳۸۷ انجام گردید، تعداد ۲۶۰ نمونه ماهی کپور معمولی از نواحی غربی، میانی و شرقی حوزه جنوبی دریای خزر (سواحل استان های گیلان، مازندران و گلستان)، تالاب انزلی، رودخانه تجن، گرگانرود و خلیج گرگان جمع آوری گردید. جهت هضم آنزیمی محصول PCR، از ۱۵ آنزیم برشی استفاده شد و در مجموع ۱۴ و ۱۲ هاپلوتیپ متفاوت به ترتیب برای ژن های ND-3/4 و ND-5/6 مشاهده گردید. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که دو ژن ND-3/4 و ND-5/6 قادر به تفکیک ژنتیکی نمونه های سواحل استان گیلان از گلستان و نمونه های رودخانه تجن از گرگانرود می باشند، اما نمونه های سواحل استان گیلان با نمونه های سواحل استان مازندران از لحاظ فراوانی هاپلوتیپ ها اختلاف معنی داری نداشتند ( $P>0/05$ ). به این ترتیب با توجه به نتایج به دست آمده، سه گروه ژنتیکی از این گونه گزارش گردید.



لالویی و همکاران در سال ۱۳۸۲، بررسی مولکولی ژن سیتوکروم b در جمعیت ماهی *Barbus capito* در آب های حوزه جنوبی دریای خزر را به روش PCR-RFLP و با استفاده از ۱۰ آنزیم انجام دادند. در این بررسی که ۶۰ نمونه باله ماهی از دریای خزر و رودخانه های استان مازندران و گیلان مورد مطالعه قرار گرفت، چند شکلی مشاهده نگردید.

در مطالعه ای که توسط قطب رزمجو و همکاران در سال ۱۳۸۷ انجام شد، ساختار ژنتیکی جمعیت گاو ماهی خزری *Neogobius caspius* در حوزه جنوبی خزر به روش PCR-PFLP و با استفاده از ۲۱ آنزیم و ژن سیتوکروم اکسیداز I، دو ژن tRNA و ناحیه D-loop ژنوم میتوکندری مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی که تعداد ۱۳۵ نمونه گاو ماهی خزری از سه منطقه در طول ساحل حوزه جنوبی دریای خزر (شامل سواحل انزلی، چالوس و بندر ترکمن) جمع آوری گردید، الگوهای هضم آنزیمی برای تمام نمونه ها مشابه بودند و چند شکلی مشاهده نگردید.

در بررسی تنوع ژن 18S rRNA در جمعیت ماهی مرکب *Sepia pharaonis* خلیج فارس و دریای عمان با روش PCR-RFLP که توسط نهاوندی و همکاران در سال ۱۳۸۳ انجام گردید، محصول PCR که به طول ۵۰۲ جفت باز برای ۲۰ تا ۴۰ ماهی مرکب به دست آمد توسط ۸ آنزیم برشی مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. در این بررسی، الگوی باندهای DNA در تمام نمونه های هضم شده مشابه بود و چند شکلی مشاهده نگردید.

#### ۱-۹-۳- پیشینه مطالعات مولکولی انجام شده به روش PCR-RFLP در آبزیان جهان

RFLP نخستین بار توسط Grodzicker و همکاران در سال ۱۹۷۴ به منظور بررسی نژادهای موتانت آدنوویروس مورد استفاده قرار گرفت و در اوایل دهه ۱۹۸۰، Botstein و همکارانش استفاده از RFLP را برای مطالعه مستقیم DNA و یافتن نشانگرهای ژنتیکی جدید پیشنهاد و معرفی کردند (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

Crosetti و همکاران در سال ۱۹۹۳ تنوع ژنتیکی در کفال خاکستری *Mugil cephalus* را با استفاده از mtDNA و ۱۳ آنزیم مورد بررسی قرار دادند. نمونه های مورد آزمایش آنها ۱۴ هاپلوטיפ مختلف و

تغییر پذیری گسترده ای با حداکثر تنوع سکوانسی ۳/۳ درصد را نشان دادند و در چهار گروه مدیترانه، شرق اقیانوس اطلس، مرکز و شرق اقیانوس آرام قرار گرفتند.

Morán و همکاران در سال ۱۹۹۵ به منظور ارزیابی میزان تنوع ژنتیکی، تنوع mtDNA را با استفاده از چهار آنزیم برشی در بین جمعیت های وحشی و پرورشی قزل آلاهی قهوه ای *Salmo trutta* L. در اسپانیا مورد بررسی قرار دادند. در این بررسی هاپلوتیپ های جمعیت های پرورشی از جمعیت های وحشی آشکارا متفاوت بود.

در پژوهشی که توسط Hanson و همکاران در سال ۱۹۹۷ به منظور بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از دو ژن ND-1 و ND-5/6 از ژنوم mtDNA و به روش PCR-RFLP در درون و ما بین سویه های پرورشی قزل آلاهی قهوه ای *Salmo trutta* L. در دانمارک انجام گردید، ۸۰ درصد از مراکز تکثیر ماهی قزل آلاهی قهوه ای دارای حداقل تنوع ژنتیکی (۰/۰۱) و فقط ۲۰ درصد از مراکز تکثیر دارای تنوع ژنتیکی ۰/۲۳ (نزدیک به تنوع ژنتیکی جمعیت های وحشی) بودند.

Chow و همکاران در سال ۱۹۹۷ ساختار ژنتیکی نیزه ماهی *Xiphias gladius* را با استفاده از روش PCR-RFLP و ناحیه D-loop در mtDNA مورد بررسی قرار دادند. آنها ۱۳ نمونه (۶ نمونه از اقیانوس آرام، سه نمونه از اقیانوس اطلس و دریای مدیترانه و دو نمونه از اقیانوس هند) را با ۴ آنزیم برشی آزمایش نمودند و ۵۲ ژنوتیپ به دست آوردند.

Gross و همکاران در سال ۱۹۹۹ در پژوهشی که به روش PCR-RFLP و با استفاده از ژن هورمون رشد (GH<sub>1</sub>) و آنزیم برشی *TaqI* در بچه ماهیان یک مرکز تکثیر ماهی آزاد اقیانوس اطلس *Salmo salar* L. در سوئد انجام دادند، ۳ هاپلوتیپ مشاهده نمودند.

در مطالعه ای که توسط Gross و همکاران در سال ۲۰۰۲ به منظور بررسی پلی مورفیسم در زیرگونه های جمعیت اروپایی *Cyprinus carpio carpio* و جمعیت آسیای شرقی *C. c. haematopterus* و با استفاده از دو ژن میتوکندریایی ND-3/4 و ND-5/6 و به روش PCR-RFLP انجام گردید، به ترتیب با استفاده از ۱۰ آنزیم برشی، ۷ هاپلوتیپ مختلف شناسایی شد.

Hilsdorf و همکاران (۲۰۰۲) با استفاده از آنالیز RFLP، mtDNA و ۲۴ آنزیم برشی، ساختار ژنتیکی جمعیت های وحشی و پرورشی *Brycon opalinus* در برزیل را مورد بررسی قرار دادند. آنها ۲۵۷ نمونه از ۷ رودخانه و یک مرکز تکثیر جمع آوری نمودند. در این بررسی ۶ آنزیم، ۲۷ هاپلوتیپ را شناسایی نمود. تنوع هاپلوتیپی در نمونه های وحشی (۰/۶۰) و پرورشی (۰/۷۵) بالا بود و تنوع نوکلئوتیدی در بین ۲۷ هاپلوتیپ، ۰/۸۲۵ درصد بود.

در پژوهشی که توسط Boudry و همکاران در سال ۲۰۰۳ انجام گردید، تنوع ژنتیکی در *Crossostrea gigas* و *Crossostrea angulata* با استفاده از روش PCR-RFLP و دو ژن میتوکندریایی CoI و 16S و ژن 28S در DNA ژنومی مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش میزان تنوع در *C. gigas* در مورد ژن CoI کمتر از ۰/۵ درصد و در مورد ژن 16S کمتر از ۰/۲ درصد بود. همچنین میزان تنوع در *C. angulata* در مورد ژن CoI کمتر از ۱/۱ درصد و در مورد ژن 16S کمتر از ۰/۲ درصد بود. در این بررسی ارتباط ژنتیکی نزدیک بین این دو گونه مورد تأیید قرار گرفت.

Lehoczky و همکاران (۲۰۰۵) تنوع ژنتیکی دو سویه وحشی از کپور ماهیانی (*Cyprinus carpio* L.) که در بانک ژن انستیتو تحقیقاتی شیلات مجارستان نگهداری می شدند را با استفاده از روش PCR-RFLP و ۴ آنزیم برشی برای ژن ND-3/4 و دو آنزیم برشی برای ژن ND-5/6 مورد بررسی قرار دادند و هیچ شواهدی مبنی بر اختلاط کپور ماهیان اروپایی و آسیایی در دو سویه مورد بررسی نیافتند.

Memis و Kohlmann در سال ۲۰۰۶ ساختار ژنتیکی کپور معمولی وحشی سه دریاچه در ترکیه را با استفاده از روش RFLP و دو ژن میتوکندریایی ND-3/4 و ND-5/6 مورد بررسی قرار دادند و ۵ هاپلوتیپ به دست آوردند.

## بخش دوم : مواد و روش ها

## ۲-۱- مواد، وسایل و دستگاه های مورد نیاز

مشخصات مواد و وسایل مصرفی و غیر مصرفی مورد استفاده برای انجام این تحقیق در جداول شماره ۲-۱ تا ۲-۶ خلاصه شده اند.

جدول ۲-۱- مشخصات مواد مصرفی مورد استفاده برای استخراج DNA با روش فنل کلروفرم

ردیف	نام ماده یا وسیله مصرفی	شرکت سازنده	کشور	توضیحات
۱	بافر استخراج (Extraction buffer یا STE)	-	-	شامل NaCl (۴ M)، SDS ۱۰٪ Tris- Hcl (۱ M) با pH= ۸ EDTA (۰/۵ M) با pH= ۸
۲	SDS (Sodium Dodecyle Sulfate)	سیناژن	ایران	۱۰٪
۳	آنزیم پروتئیناز K (Proteinase K)	Fermentase	امریکا	با غلظت ۱۰ mg/ml
۴	فنل سیر شده	Bioflux	چین	با pH = ۷/۵ تا ۸
۵	ایزوامیل الکل (Isoamyl alcohol)	Merck	آلمان	-
۶	کلروفرم (Cholorophorm)	Merck	آلمان	-
۷	اتانول	Merck	آلمان	مطلق و ۷۰ درصد
۸	NaCl	Merck	آلمان	۴ M
۹	Tris- Hcl	Merck	آلمان	-
۱۰	آب مقطر دو بار تقطیر	-	ایران	-
۱۱	EDTA	Merck	آلمان	-
۱۲	میکروتیوب های ۰/۵ ، ۱/۵ و ۲ میلی لیتری	Eppendorf	آلمان	-
۱۳	سرسمپلر ۰/۵ ، ۱/۵ و ۲ میلی لیتری	Eppendorf	آلمان	-

جدول ۲-۲- مشخصات مواد مصرفی مورد استفاده برای انجام واکنش PCR و تکثیر ژن هدف

ردیف	نام ماده یا وسیله مصرفی	شرکت سازنده	کشور	توضیحات
۱	DNA ماهی سوکلا	-	-	-
۲	پرایمر Primer	Metabion	آلمان	یک جفت برای هر ژن (COI و ND2)
۳	مخلوط dNTP (dNTP Mix)	سیناژن	ایران	حاوی ۱۰ میلی مول از هر یک از نوکلئوتیدهای خالص dTTP, dATP, dCTP و dGTP در بافری با pH = ۷/۵ Vol. ۰/۵ ml
۴	آنزیم Taq DNA Polymerase	سیناژن	ایران	حاوی ۵ واحد Taq DNA Polymerase در هر میکرولیتر از محلول
۵	بافر PCR (10X)	سیناژن	ایران	شامل Kcl (۵۰۰ mM) و Tris Hcl (۲۰۰ mM) Vol. ۱ ml
۶	MgCL <sub>2</sub>	سیناژن	ایران	با غلظت ۵۰ mM Vol. ۱ ml

جدول ۳-۲- مشخصات مواد مصرفی مورد استفاده برای انجام الکتروفورز ژل آگارز

ردیف	نام ماده یا وسیله مصرفی	شرکت سازنده	کشور	توضیحات
۱	آگارز	سیناژن	ایران	-
۲	بافر سنگین کننده loading buffer	-	-	شامل گلیسرول، بروموفنل بلو (۱ درصد)، سایبر گرین و EDTA (۶۰ mM) با pH=۸
۳	Syber Green	Invitrogene	امریکا	-
۴	Tris	سیناژن	ایران	-
۵	EDTA	سیناژن	ایران	-
۶	بافر TAE (1X و 10X)	-	-	شامل Tris، اسید استیک و EDTA (۰/۵ mM) با pH=۸
۷	شاخص های وزنی DNA (DNA Ladder یا مارکر)	سیناژن	ایران	۱۰۰ bp

جدول ۲-۴- مشخصات مواد مصرفی مورد استفاده برای انجام الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید

ردیف	نام ماده یا وسیله مصرفی	شرکت سازنده	کشور	توضیحات
۱	اکریل آمید	سیناژن	ایران	٪۱۰
۲	بیس اکریل آمید	Sigma	آلمان	-
۳	بافر سنگین کننده loading buffer	-	-	شامل گلیسرول، بروموفنل بلو (۱ درصد) و EDTA (۰/۵ M) با pH= ۸
۴	NaoH	Merck	آلمان	-
۵	TEMED	Merck	آلمان	-
۶	اتانول	Merck	آلمان	خالص
۷	آمونیم پرسولفات (APS)	Merck	آلمان	٪۱۰
۸	بافر TBE (۱X و ۱۰ X)	-	-	شامل Tris ، اسید بوریک و EDTA (۰/۵ mM) با pH= ۸
۹	شاخص های وزنی DNA (DNA Ladder یا مارکر)	Fermentase	فرانسه	۵۰ bp
۱۰	استیک اسید	Merck	آلمان	-
۱۱	نیتрат نقره	Merck	آلمان	-
۱۲	فرمالین	Merck	آلمان	-
۱۳	NaBH <sub>4</sub>	Merck	آلمان	-
۱۴	آب مقطر	-	ایران	-



جدول ۲-۵- مشخصات تجاری آنزیم های برشی (Restriction enzymes) مورد استفاده

ردیف	نام آنزیم برشی	شرکت سازنده	کشور
۱	<i>XapI (ApoI)</i>	Fermentase	امریکا
۲	<i>AluI</i>		
۳	<i>BsrI</i>		
۴	<i>HaeIII</i>		
۵	<i>MboII</i>		
۶	<i>ScrFI</i>		
7	<i>AseI</i>		
8	<i>HphI</i>		
9	<i>RsaI</i>		

جدول ۲-۶- مشخصات وسایل غیر مصرفی و دستگاه های مورد استفاده

ردیف	شرح	شرکت سازنده	کشور تولید کننده
۱	سمپلر ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتری	Soccorex	سوئیس
۲	ترمومیکسر	Eppendorf	آلمان
۳	میکروسانتریفیوژ یخچالدار	Eppendorf	آلمان
۴	میکروسانتریفیوژ معمولی	Hettich	آلمان
۵	بیوفتومتر	Eppendorf	آلمان
۶	ترموسایکلر	Eppendorf	آلمان
۷	الکتروفورز افقی	اختریان	ایران
۸	الکتروفورز عمودی	اختریان	ایران
۹	مولد برق	اختریان	ایران
۱۰	دستگاه عکس برداری از ژل	Uvi tec	جامعه اقتصادی اروپا (اتحادیه اروپا ۱)
۱۱	بن ماری	Memmert	آلمان
۱۲	هم زن <sup>۲</sup>	اختریان	ایران
۱۳	هود معمولی	آرتا آزما	ایران
۱۴	هود لامینار	Labtech	کره
۱۵	اتوکلاو	All american	امریکا
۱۶	چراغ الکلی	فردوس رأی	ایران

## ۲-۲- روش انجام تحقیق

1- EEC

2- Shaker

## ۲-۲-۱- نمونه برداری

با توجه به دامنه پراکنش بسیار مناسب ماهی سوکلا در آب های جنوبی کشور (شکل ۱-۱)، نمونه برداری در ماه های اسفند ۸۷ و مهر ۸۸ و در چهار استان سیستان و بلوچستان (میدانی، درک، گالک)، هرمزگان (ضلع جنوبی جزیره قشم)، بوشهر (بندر بوشهر، بندر دیر، ضلع جنوبی جزیره خارک) و خوزستان (بندر ماهشهر و خور موسی) انجام گردید که به عنوان ایستگاه های تحقیقاتی مورد نظر قرار گرفتند.

نمونه برداری به صورت تصادفی و به تعداد ۳۰ عدد ماهی از صیدگاه های نامبرده در هر استان انجام گردید. نمونه گیری از بافت نرم باله سینه ای هر ماهی (حدود ۱/۵ الی ۲ سانتیمتر) انجام و بافت ها به طور جداگانه درون میکروتیوب های ۲ میلی لیتری حاوی اتانول ۷۰ درصد قرار داده شد و میکروتیوب ها پس از برچسب گذاری به آزمایشگاه علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی قشم انتقال یافتند. به این ترتیب تعداد کل نمونه در این تحقیق ۱۲۰ نمونه بافت باله سینه ای از ۱۲۰ عدد ماهی سوکلا منظور گردید.

## ۲-۲-۲- استخراج DNA

در این بررسی، استخراج DNA به روش فنل کلروفرم (Taggart, 1992) و در آزمایشگاه علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی قشم انجام گردید. در این روش، DNA سلول از طریق شکستن سلول ها و جدا نمودن پروتئین ها و هیدرات های کربن از اسیدهای نوکلئیک و در نهایت رسوب دادن DNA به وسیله اتانول مطلق از هر نمونه بافت استخراج می شود. هر نوبت استخراج DNA با روش فنل کلروفرم، در سه روز متوالی به شرح دستورالعمل ذیل انجام گردید.

### روز اول:

۱- ابتدا حدود ۱۵۰ تا ۲۰۰ میلی گرم از بافت باله ماهی جدا گردیده بر روی کاغذ صافی قرار گرفت تا الکل آنها جذب شود.

۲- سپس بافت های جدا شده به صورت مجزا درون میکروتیوب های ۲ میلی لیتری حاوی ۸۵۰ میکرولیتر بافر استخراج قرار داده شده و با استفاده از قیچی به خوبی خرد گردیدند.

۳- مقدار ۷ میکرولیتر آنزیم پروتئیناز K به هر میکروتیوب اضافه شد و میکروتیوب ها به منظور مخلوط شدن محتویات آنها، ۵ الی ۷ مرتبه به آرامی سرو ته شدند.

۴- به دلیل آن که فعالیت بهینه آنزیم پروتئیناز K (آنزیم ویژه شکستن پروتئین ها) در دمای ۵۰ الی ۶۰ درجه سانتی گراد انجام می گردد، میکروتیوب ها به مدت ۶ ساعت در ترمومیکسر با دمای ۵۵ درجه سانتی گراد و سرعت ۸۵۰ دور در دقیقه (rpm<sup>۱</sup>) قرار داده شدند، به طوری که نمونه های بافت در پایان مدت زمان مذکور، به طور کامل همگن گردیدند و به صورت امولسیون یکنواختی در آمدند. (در پایان روز اول می توان به جای ترمومیکسر، از بن ماری یا دمای ۵۵ درجه سانتی گراد در طول شب<sup>۲</sup> استفاده نمود).

#### روز دوم:

در روز دوم، تمامی مراحل در زیر هود لامینار انجام گردید.

۱- ابتدا ۴۲۵ میکرولیتر فنل سیر شده و سپس ۴۲۵ میکرولیتر کلروفرم- ایزوآمیل الکل (با نسبت ۱:۲۴) به میکروتیوب ها اضافه شد و جهت مخلوط شدن فنل سیر شده با کلروفرم- ایزوآمیل الکل، میکروتیوب ها ۶ الی ۷ مرتبه به آرامی سرو ته شدند.

به منظور تهیه محلول کلروفرم- ایزوآمیل الکل با نسبت ۱:۲۴، ابتدا ۱۰۰۰ میکرولیتر (۱ سی سی) ایزوآمیل الکل درون یک استوانه مدرج به حجم ۲۵ سی سی ریخته شد و بقیه حجم استوانه مدرج (یعنی ۲۴ سی سی) کلروفرم اضافه گردید.

۲- سپس تیوب ها به مدت ۱۰ دقیقه داخل میکروسانتریفیوژ یخچال دار با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند.

۳- پس از سانتریفیوژ، درون هر میکروتیوب دو فاز تشکیل گردید که فاز فوقانی حاوی DNA و فاز زیرین شامل مواد آلی سلول ها است. ۸۰۰ میکرولیتر از فاز فوقانی توسط سرسمپلر دهانه گشاد درون

- میکروتیوب ۲ میلی لیتری جدیدی ریخته شد. (به منظور برداشتن فاز فوقانی، از سرمپلر با دهانه گشاد به قطر تقریبی ۳ میلی متر استفاده شد تا از صدمه دیدن DNA جلوگیری شود. لذا نوک سرمپلر با قیچی چیده شد.)
- ۴- سپس سه مرحله قبل تکرار گردید تا مواد آلی، هر چه بیشتر و بهتر از DNA جدا گردیده و DNA خالص تر گردد. (در این مرحله، ۷۰۰ میکرولیتر از فاز فوقانی توسط سرمپلر دهانه گشاد برداشته شد.)
- ۵- ۷۰۰ میکرولیتر کلروفرم- ایزوآمیل الکل به هر میکروتیوب اضافه شد و میکروتیوب ها ۵ الی ۶ مرتبه سر و ته گردیدند.
- ۶- مرحله ۲ تکرار گردید و سپس ۵۰۰ میکرولیتر از فاز فوقانی هر تیوب ۲ میلی لیتری توسط سرمپلر دهانه گشاد داخل یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری ریخته شد.
- ۷- سپس ۵۰ میکرولیتر کلرید سدیم ۴ مولار و ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول سرد (۲۰- درجه سانتی گراد) به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری اضافه شده و میکروتیوب ها به مدت یک شب در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار گرفتند.

#### روز سوم:

- ۱- میکروتیوب ها با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال دار قرار داده شدند تا تمام DNA در آنها ته نشین شود.
- ۲- سپس اتانول به آهستگی تخلیه شد (باید دقت شود تا رسوب DNA از ته میکروتیوب جدا نشود). سپس میکروتیوب ها در حالی که در آنها باز بود، به صورت واژگون به مدت ۱۰ ثانیه روی یک دستمال کاغذی قرار گرفتند تا خشک شوند.
- ۳- به منظور شستشوی DNA، ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد به آهستگی درون هر میکروتیوب ریخته شد.
- ۴- بعد از یک ساعت، تمام اتانول به آرامی از تیوب ها بیرون ریخته شد و میکروتیوب های حاوی رسوب DNA روی دستمال کاغذی، واژگون گردیده و بعد از چند ثانیه، میکروتیوب ها به صورت مایل و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفته خشک شدند.

۵- سپس ۵۰ میکرولیتر آب مقطر خالص درون هر میکروتیوب ریخته شد تا DNA به آرامی در آب مقطر حل گردد.

به همین ترتیب، ۱۲۰ میکروتیوب حاوی DNA استخراج شده از بافت باله ۱۲۰ عدد ماهی سوکلا به دست آمد که پس از تأیید وجود DNA در آنها و تعیین کمیت و کیفیت DNA، برای تهیه محصول PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

### ۲-۲-۳- تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده

کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از دستگاه بیوفتومتر و الکتروفورز افقی تعیین گردید.

### ۲-۲-۳-۱- تعیین کمیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه بیوفتومتر

دستگاه بیوفتومتر مقدار DNA استخراج شده را از روی میزان جذب نوری (OD) تعیین می کند. با استفاده از این دستگاه، جذب نوری DNA استخراج شده مربوط به هر نمونه در طول موج ۲۶۰ تا ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری و نسبت OD260/OD280 محاسبه و غلظت DNA بر حسب میکروگرم در میلی لیتر ( $\mu\text{g/ml}$ ) اندازه گیری می گردد. چنانچه این نسبت بیشتر از ۱/۸ و کمتر از ۲/۰۰ باشد، کمیت یا غلظت DNA مناسب است. اگر این نسبت کمتر از ۱/۸ باشد، بیانگر ناخالصی DNA با فنل و پروتئین است و اگر نسبت به دست آمده بیشتر از ۲/۰۰ باشد، DNA دارای ناخالصی با RNA است.

در این بررسی به منظور اندازه گیری کمیت DNA استخراج شده، ابتدا مقدار ۴۹۵ میکرولیتر آب مقطر درون سل ویژه بیوفتومتر ریخته شده سپس مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه DNA استخراج شده به آن اضافه گردید. آنگاه سل در جایگاه ویژه خود درون دستگاه بیوفتومتر قرار داده شده و غلظت DNA بر حسب میکروگرم در میلی لیتر، اندازه گیری و ثبت گردید.

### ۲-۲-۳-۲- بررسی کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه الکتروفورز

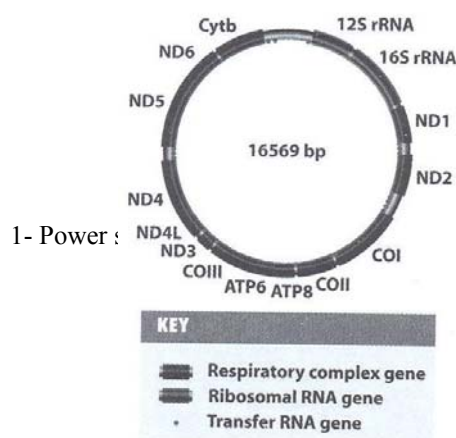
به منظور تعیین کیفیت DNA استخراج شده از طریق الکتروفورز روی ژل آگارز، ابتدا ژل آگارز ۲ درصد تهیه گردید. برای تهیه ژل آگارز ۲ درصد، ۰/۲ گرم آگارز درون ارلن ریخته شد و سپس ۱۰ میلی لیتر بافر TAE (1X) به آن افزوده گردید. آنگاه ارلن روی شعله چراغ گاز آزمایشگاهی و در زیر هود معمولی حرارت داده شد تا آگارز به طور کامل در آن حل شده و محلول شفاف حاصل گردد. پس از تهیه آگارز مذاب، محلول آگارز به آرامی درون سینی ویژه ژل ریخته شد که قبلاً یک شانه ۹ شاخه درون آن قرار داده شده بود، به طوری که شانه ۱ میلی متر از کف سینی فاصله داشت. شانه پس از منعقد شدن ژل، به آرامی خارج شد و سینی ژل درون تانک الکتروفورز حاوی بافر TAE (1X) قرار گرفت، طوری که بافر روی ژل را کاملاً می پوشاند.

بر روی یک تکه پارافیلیم، ۵ میکرولیتر از هر نمونه DNA استخراج شده قرار داده شد و سپس ۳ میکرولیتر بافر سنگین کننده به هر نمونه افزوده شد. مخلوط های حاصل توسط سمپلر به طور جداگانه و به دقت درون چاهک های موجود در ژل ریخته شد. درون چاهک آخر نیز مارکر ۱۰۰ جفت بازی ریخته شد. آنگاه تانک الکتروفورز به منبع مولد جریان برق<sup>۱</sup> متصل و منبع مولد جریان برق روی ۹۰ ولت و ۴۵ میلی آمپر تنظیم گردید. پس از مشاهده رنگ در انتهای ژل، ژل از تانک الکتروفورز خارج شده داخل دستگاه عکس برداری از ژل قرار گرفت و پس از تهیه عکس، کیفیت و وزن مولکولی DNA استخراج شده با توجه به مارکر مورد ارزیابی قرار گرفت.

مشخصات پودر آگارز، بافر TAE، بافر سنگین کننده و مارکر در جدول ۲-۳ نشان داده شده است. جدول ۲-۵ نیز مشخصات منبع مولد برق و دستگاه عکس برداری از ژل را نشان می دهد.

## ۲-۲-۴ ژن ها و پرایمرهای مورد استفاده

در این مطالعه، از میان ژن هایی که در ژنوم



میتوکندری (mtDNA) ماهی سوکلا در بانک جهانی ژن (NCBI) موجود بودند (شامل COIII, COII, COI اکسیداز I (CoI) و NADH2 (ND2) مورد نظر قرار گرفتند که دارای اندازه قابل قبولی بوده و برای مطالعات جمعیت در سایر گونه ها کاربرد داشته اند. (دو ژن 12SrRNA و 16SrRNA ، اگر چه در ژنوم میتوکندری ماهی سوکلا وجود دارند، اما توالی آنها در بانک جهانی ژن موجود نبود). شکل ۱-۲ ، جایگاه این دو ژن در ژنوم میتوکندریایی را نشان می دهد (Brown, 2007).

#### شکل ۱-۲- جایگاه دو ژن CoI و ND2

در ژنوم میتوکندریایی

اقتباس از : Brown, 2007

#### ۲-۲-۵- طراحی پرایمر

در این بررسی، طراحی پرایمر بر اساس توالی ژن سیتوکروم اکسیداز I (CoI) و ژن NADH2 (ND2) واقع در mtDNA ماهی سوکلا، موجود در در بانک جهانی ژن و با استفاده از نرم افزار GENE RUNNER انجام گردید و دو زوج پرایمر به طول ۲۰ باز (برای ژن ND2) و ۱۹ باز (برای ژن CoI) انتخاب و جهت سنتز، به شرکت Metabion سفارش داده شد. جدول ۲-۷، مشخصات ژن ها و پرایمرهای مورد استفاده برای هر ژن را نشان می دهد.

#### جدول ۲-۷- مشخصات ژن ها و پرایمرهای مورد استفاده

نام ژن	شماره دستیابی ژن	نام پرایمر	توالی پرایمر
			RaCo F: 5'-AAC CAC CGC TAA ACA CTC-3'



RaCo R:	5'-GCC AGC TAA AGA CTT TAA C-3'	RaCo	EF609583.1	CoI
Rna Rach F:	5'-TCT TAG TGC TTC CAA TAC AC-3'	Rna Rach	DQ279821.1	ND2
Rna Rach R:	5'-CCT ACC TGT CTA GAA AGG C-3'			

پرایمرها طبق دستور شرکت سازنده با نسبت ۲۰ پیکومول در هر میکرولیتر آب مقطر رقیق گردیده سپس به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ شده و آنگاه به مدت ۲ ساعت در بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و سپس در ۲۰- درجه سانتی گراد قرار گرفتند.

## ۲-۲-۶- تکثیر ژن هدف با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)

برای انجام واکنش PCR نمونه های DNA به مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشکده پزشکی دانشگاه شهید بهشتی منتقل گردیدند. به منظور انجام واکنش PCR در هر میکروتیوب ۰/۲ میلی لیتری، ۵ میکرولیتر بافر PCR، ۱/۵ میکرولیتر MgCl<sub>2</sub>، ۱ میکرولیتر dNTP، ۲ میکرولیتر پرایمر، ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم DNA پلی مراز Taq و ۱ میکرولیتر DNA استخراج شده ریخته و سپس حجم تیوب با افزودن آب مقطر به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد. مشخصات مواد مورد استفاده جهت انجام واکنش PCR در جدول ۲-۲ آورده شده است. مواد فوق ابتدا درون تیوب ۰/۲ میلی لیتری توسط سمپلر به خوبی مخلوط شده و سپس به منظور ته نشین شدن مواد در تیوب، به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ گردید. آنگاه میکروتیوب داخل دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت. ترموسایکلر مورد استفاده در این تحقیق، ظرفیت ۲۵ میکروتیوب ۰/۲ میلی لیتری در هر نوبت انجام واکنش را دارا بود. جدول ۲-۵ مشخصات این دستگاه را نشان می دهد. در این بررسی، واکنش PCR طبق برنامه حرارتی و زمان بندی مندرج در جدول ۲-۸ انجام گردید.

## جدول ۲-۸- برنامه حرارتی و زمان بندی دستگاه ترموسایکلر برای انجام واکنش PCR

مرحله اول:			
نام زیر مرحله	دما (درجه سانتی گراد)	زمان	تعداد چرخه
واسرشته سازی اولیه Denaturation	۹۴	۵ دقیقه	۱ چرخه
مرحله دوم:			
نام زیر مرحله	دما (درجه سانتی گراد)	زمان	تعداد چرخه
واسرشته سازی Denaturation	۹۴	۳۰ ثانیه	

اتصال	Annealing	۵۰	۳۰ ثانیه	۳۰ چرخه
توسعه	Extention	۷۲	۴۵ ثانیه	
مرحله سوم:				
نام زیر مرحله	دما (درجه سانتی گراد)	زمان	تعداد چرخه	
توسعه نهایی	Extention	۷۲	۵ دقیقه	۱ چرخه

به منظور دستیابی به بهترین برنامه واکنش و تولید بهترین محصول PCR، مقدار بهینه DNA و نیز دمای اتصال بهینه، برای حجم واکنش ۵۰ میکرولیتر، بعد از چندین بار آزمایش و تکرار به دست آمد.

## ۷-۲-۲- بررسی کمیت و کیفیت محصول PCR

به منظور آشکارسازی و تأیید صحت انجام واکنش و وجود محصول PCR، مقدار ۵ میکرولیتر از محلول موجود در هر تیوب ۰/۲ میکرولیتری، به روش الکتروفورز با ژل آگارز ۲ درصد و مقایسه با مارکر ۱۰۰ جفت بازی مورد ارزیابی قرار گرفت.

## ۸-۲-۲- انتخاب آنزیم های برشی

در این بررسی با استفاده از توالی دو ژن میتوکندریایی CoI و ND2 ماهی سوکلا موجود در بانک جهانی ژن و نیز با استفاده از نرم افزار Webcutter، ۶ آنزیم برای هضم آنزیمی محصول PCR حاصل از تکثیر ژن CoI و ۷ آنزیم برای هضم آنزیمی محصول PCR حاصل از تکثیر ژن ND2 انتخاب گردید. آنزیم های مورد نیاز برای انجام RFLP، طوری انتخاب شدند که تا حد امکان، این دو ژن را به قطعات با اندازه قابل مشاهده و قابل تفکیک از یکدیگر تقسیم نمایند. جداول ۹-۲ و ۱۰-۲، جایگاه های برش، تعداد قطعات، طول هر قطعه و طول کل قطعات دو ژن فوق الذکر را پس از تأثیر هر یک از آنزیم های مورد نظر نشان می دهد.

جدول ۹-۲- جایگاه های برش، تعداد قطعات، طول هر قطعه و طول کل قطعات مورد انتظار پس از تأثیر هر یک از آنزیم های *HaeIII*, *AseI* در محصول PCR ژن میتوکندریایی ND2 در ماهی سوکلا (بر اساس توالی نوکلئیدی گزارش شده در بانک جهانی ژن)

<i>BsrI</i>				<i>ApoI</i>			
جایگاه های برش	تعداد قطعات	طول هر قطعه (bp)	طول کل قطعات (bp)	جایگاه های برش	تعداد قطعات	طول هر قطعه (bp)	طول کل قطعات (bp)
۳۴۳		۹۰		۳۵۲		۳۵۲	
۱۲۱۰	۳	۳۴۳	۱۲۹۹	۷۱۲	۳	۳۶۰	۱۲۹۹
		۸۶۷				۵۸۸	
<i>AseI</i>				<i>HphI</i>			
جایگاه های برش	تعداد قطعات	طول هر قطعه (bp)	طول کل قطعات (bp)	جایگاه های برش	تعداد قطعات	طول هر قطعه (bp)	طول کل قطعات (bp)
۹۳۶		۴۴		۲۴۶		۱۴۲	
۱۰۸۰	۴	۱۰۵	۱۲۹۹	۸۰۸	۴	۲۰۴	۱۲۹۹
۱۱۵۹		۱۱۵		۹۵۰		۳۵۰	
		۹۳۶				۵۶۲	
<i>RsaI</i>				<i>HaeIII</i>			
جایگاه های برش	تعداد قطعات	طول هر قطعه (bp)	طول کل قطعات (bp)	جایگاه های برش	تعداد قطعات	طول هر قطعه (bp)	طول کل قطعات (bp)
۹۴		۵۲		۵۷		۵۷	
۱۴۶		۹۴		۱۹۳		۱۳۶	
۴۳۰	۵	۲۸۴	۱۲۹۹	۴۰۵	۵	۲۱۲	۱۲۹۹
۹۷۶		۳۲۴		۸۵۳		۴۴۶	
		۵۴۶				۴۴۸	
<i>MboII</i>							
جایگاه های برش	تعداد قطعات	طول هر قطعه (bp)	طول کل قطعات (bp)				
۱۲۵		۵۳					
۷۳۷		۱۱۱					
۹۷۱	۶	۱۲۵	۱۲۹۹				
۱۱۳۶		۱۶۵					
۱۲۴۷		۲۳۴					
		۶۱۲					

جدول ۲-۱۰- جایگاه های برش، تعداد قطعات، طول هر قطعه و طول کل قطعات مورد انتظار پس از تأثیر هر یک از آنزیم های *HaeIII*, *AluI* در محصول PCR ژن میتوکندریایی CoI در ماهی سوکلا (بر اساس توالی نوکلئوتیدی گزارش شده در بانک جهانی ژن)

<i>ApoI</i>				<i>AluI</i>			
جایگاه های برش	تعداد قطعات	طول هر قطعه (bp)	طول کل قطعات (bp)	جایگاه های برش	تعداد قطعات	طول هر قطعه (bp)	طول کل قطعات (bp)
۳۸۶		۶۱۰		۳۸۶		۶۱۰	
۹۹۶	۳	۳۸۶	۱۰۰۱	۹۹۶	۳	۳۳۱	۱۰۰۱

۱۰۰				۵			
<i>BsrI</i>				<i>HaeIII</i>			
جایگاه های برش	تعداد قطعات	طول هر قطعه (bp)	طول کل قطعات (bp)	جایگاه های برش	تعداد قطعات	طول هر قطعه (bp)	طول کل قطعات (bp)
۱۲۶	۶۲۱	۳۶۸	۱۷۶	۱۲۶	۶۲۱	۳۶۸	۱۷۶
۷۴۷	۱۲۸	۲۲۹	۴۰۵	۷۴۷	۱۲۸	۲۲۹	۴۰۵
۸۷۳	۱۲۶	۲۲۸	۶۳۳	۸۷۳	۱۲۶	۲۲۸	۶۳۳
	۱۲۶	۱۷۶			۱۲۶	۱۷۶	
<i>MboII</i>				<i>SrfI</i>			
جایگاه های برش	تعداد قطعات	طول هر قطعه (bp)	طول کل قطعات (bp)	جایگاه های برش	تعداد قطعات	طول هر قطعه (bp)	طول کل قطعات (bp)
۱۶۲	۴۷۳	۲۵۶	۲۳۲	۱۶۲	۴۷۳	۲۵۶	۲۳۲
۶۳۵	۲۲۴	۲۳۲	۳۷۸	۶۳۵	۲۲۴	۲۳۲	۳۷۸
۷۷۷	۱۶۲	۱۶۲	۵۰۱	۷۷۷	۱۶۲	۱۶۲	۵۰۱
	۱۴۲	۱۴۶	۵۸۳		۱۴۲	۱۴۶	۵۸۳
		۱۲۳	۷۴۵			۱۲۳	۷۴۵
		۸۲				۸۲	

## ۲-۲-۹- هضم آنزیمی محصول PCR (RFLP)

به منظور انجام واکنش RFLP در هر تیوب ۰/۵ میلی لیتری، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم، ۲ میکرولیتر بافر ویژه همان آنزیم و ۱۰ میکرولیتر محصول PCR ریخته و سپس حجم میکروتیوب با افزودن آب مقطر به ۲۰ میلی لیتر رسانده شد. سپس میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، در بن ماری با دمای مشخص برای مدت ۲ ساعت نگهداری شدند. طبق دستورالعمل شرکت سازنده آنزیم های مورد استفاده (Fermentase)، دمای انکوباسیون تمام آنزیم ها ۳۷ درجه سانتی گراد بود، به استثنای آنزیم *BsrI* که ۶۵ درجه سانتی گراد معین شده بود.

بعد از سپری شدن مدت زمان انکوباسیون، به منظور مشاهده قطعات برش خورده، از ژل آگارز ۲ درصد و یا ژل پلی اکریل آمید ۱۰ درصد استفاده گردید.

## ۲-۲-۱۰- آشکارسازی قطعات حاصل از هضم آنزیمی با استفاده از ژل آگارز

۱۰ میکرولیتر از محصول PCR که پس از هضم آنزیمی، به قطعات مورد انتظار تجزیه شده بود، با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردید. به منظور تعیین اندازه قطعات به دست آمده، در دو چاهک انتهایی ژل، به ترتیب ۱ میکرولیتر مارکر و ۲ میکرولیتر بافر سنگین کننده به عنوان شاخص اندازه گیری و ۵ میکرولیتر از محصول PCR و ۲ میکرولیتر بافر سنگین کننده به عنوان شاهد ریخته شد. بعد از رسیدن رنگ به انتهای ژل، ژل از تانک الکتروفورز خارج گردیده و پس از تهیه عکس توسط دستگاه عکس برداری از ژل، اندازه قطعات به دست آمده با توجه به مارکر و جداول ۲-۹ و ۲-۱۰ مورد بررسی قرار گرفت.

#### ۲-۹-۲- آشکارسازی قطعات حاصل از هضم آنزیمی با استفاده از ژل پلی اکریل آمید

به منظور آماده نمودن قالب ژل، ابتدا دو صفحه شیشه ای مربوطه با آب یا الکل ۷۰ درصد به خوبی شستشو و خشک شدند. سپس سه قطعه فضا ساز<sup>۱</sup> به ضخامت ۱ میلی متر در طرفین و پایین، مابین دو صفحه شیشه ای قرار گرفته و دو صفحه توسط گیره به یکدیگر متصل شدند. برای پر کردن فضاهای بین صفحات شیشه ای و قطعات فضا ساز و در نتیجه جلوگیری از نشت ژل به خارج از قالب، از محلول آگار ۱۰ درصد استفاده شد. قالب آماده شده روی پایه مخصوص نصب گردید تا هم ثابت بماند و هم کاملاً عمود بر سطح میز قرار گیرد.

برای تهیه ژل، ابتدا ۵۰ میلی لیتر محلول پلی اکریل آمید (اکریل آمید + بیس اکریل آمید) فراهم شد. به این منظور ۱۴/۵ گرم اکریل آمید و ۰/۵ گرم بیس اکریل آمید با افزودن آب مقطر به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده شد. به منظور تهیه ژل پلی اکریل آمید ۶ درصد در حجم ۷۰ میلی لیتر، به ۱۲/۵ میلی لیتر از محلول پلی اکریل آمید فوق، ۶ میلی لیتر بافر TBE (۱۰ X)، ۵۱۴ میکرولیتر آمونیوم پرسولفات (APS) ۱۰٪ و ۶۷ میکرولیتر TEMED اضافه شد و سپس با افزودن ۵۰ میلی لیتر آب مقطر، حجم محلول حاصل، به ۷۰ میلی لیتر رسانده شد. (قابل ذکر است که برای تهیه ۱ میلی لیتر محلول آمونیوم پرسولفات، ۰/۱ گرم

---

1- Spacer

آمونیم پرسولفات به ۱ میلی لیتر آب مقطر اضافه می شد). محلول به دست آمده به آرامی تکان داده شده سپس در قالب مربوطه ریخته شد که قبلاً آماده گردیده بود. پس از پر نمودن فضای قالب با محلول ژل، شانه به آرامی درون ژل قرار گرفته و حدود ۲ سانتی متر از آن وارد ژل گردید. قابل توجه است که حباب هوا مانع از انجام الکتروفورز می شود، لذا به هنگام ریختن محلول ژل درون قالب باید از ایجاد حباب هوا جلوگیری نمود. پس از انعقاد کامل ژل، شانه به آرامی خارج گردیده و فضای داخل چاهک ها با آب مقطر به خوبی شسته شدند. آنگاه قالب حاوی ژل درون تانک الکتروفورز قرار گرفت و داخل محفظه تحتانی و فوقانی تانک، از بافر TBE (1X) پر شد، به طوری که چاهک ها را کاملاً پر نمود. به منظور جلوگیری از تشکیل حباب در قسمت تحتانی قالب و زیر ژل، ابتدا محفظه تحتانی تانک از بافر پر گردید و سپس قالب به صورت مایل وارد محفظه تحتانی تانک گردید. در صورت ایجاد حباب هوا، حباب ها با استفاده از سرنگ حاوی بافر خارج می شدند.

برای قرار دادن نمونه درون هر چاهک، ۱۰ میکرولیتر از نمونه به ۳ میکرولیتر بافر سنگین کننده اضافه شد و توسط سمپلر داخل چاهک ها ریخته شد. به منظور تعیین اندازه قطعات حاصل از هضم آنزیمی، درون یک چاهک، ۱ میکرولیتر مارکر و ۲ میکرولیتر بافر سنگین کننده ریخته شد. پس از نمونه گذاری، تانک الکتروفور به منبع مولد جریان برق متصل گردیده و پس از رسیدن رنگ به انتهای ژل، منبع مولد جریان برق خاموش شده و قالب از پایه جدا گردید.

به منظور آشکارسازی قطعات حاصل از هضم آنزیمی در ژل پلی اکریل آمید، از رنگ آمیزی نترات نقره استفاده گردید. برای رنگ آمیزی نترات نقره، تهیه سه نوع محلول شامل محلول شستشو (A)، محلول رنگ آمیزی (B) و محلول ظهور (C) مورد نیاز می باشد و رنگ آمیزی در سه مرحله انجام می شود. جدول ۱۱-۲ ترکیبات تشکیل دهنده هر یک از سه محلول فوق را نشان می دهد.

برای انجام مرحله اول رنگ آمیزی، ابتدا دو صفحه شیشه ای واقع در طرفین ژل از یکدیگر جدا شدند و ژل که به یکی از دو صفحه اتصال داشت، به آرامی داخل تشت حاوی نیمی از محلول A قرار گرفت

و تشت به مدت ۳ دقیقه بر روی شیکر<sup>۱</sup> قرار داده شد. سپس محلول A با مایل نمودن تشت حاوی ژل، به آرامی دور ریخته شد و شستشوی ژل با نیم دیگر از محلول A به همان ترتیب فوق تکرار گردید.

در مرحله دوم، تمام محلول B درون تشت حاوی ژل ریخته شد و تشت به مدت ۱۰ دقیقه بر روی شیکر قرار گرفت. سپس محلول B با مایل نمودن تشت حاوی ژل، به آرامی دور ریخته شد و ژل با افزودن آب مقطر و تکان دادن تشت به مدت ۴۵ ثانیه شستشو گردید. برای انجام مرحله سوم نیز تمام محلول C درون تشت حاوی ژل ریخته شد و تشت تا ظهور کامل باندهای تیره رنگ در ژل بر روی شیکر قرار گرفت. پس از ظهور کامل باندها، ژل رنگ آمیزی شده به یک پوشش نایلونی انتقال یافته و برای تهیه عکس درون دستگاه عکس برداری از ژل قرار گرفت.

جدول ۲-۹- ترکیبات محلول رنگ آمیزی ژل پلی اکریل آمید به روش نیترا ت نقره

ردیف	نام محلول	نام مواد تشکیل دهنده	مقدار
۱	محلول شستشو یا محلول A (در حجم ۸۰۰ میلی لیتر)	اتانول اسید استیک آب مقطر	۸۰ میلی لیتر (۱۰ درصد از حجم محلول رنگ آمیزی) ۴ میلی لیتر (۰/۵ درصد از حجم محلول رنگ آمیزی) ۷۲۰ میلی لیتر
۲	محلول رنگ آمیزی یا محلول B	نیترا ت نقره آب مقطر	۰/۴ گرم (۰/۱ درصد از حجم محلول رنگ آمیزی) ۴۰۰ میلی لیتر
۳	محلول ظهور یا محلول C	فرمالدئید NaOH NaBH4 آب مقطر	۲/۴ میلی لیتر (۰/۱۵ درصد از حجم محلول رنگ آمیزی) ۹ گرم (۴/۵ درصد از حجم محلول رنگ آمیزی) ۰/۰۶ گرم (۰/۱ درصد از حجم محلول رنگ آمیزی) ۶۰۰ میلی لیتر

## ۲-۲-۱۲- آنالیز آماری و پردازش داده ها

پس از انجام RFLP و هضم آنزیمی تمام نمونه های محصول PCR حاصل از هر دو ژن COI و ND2، اندازه باندهای حاصل از تأثیر هر آنزیم در محصول PCR هر ژن، توسط نرم افزار UVITech و با توجه به اندازه باندهای مارکر مورد استفاده مشخص گردید. سپس الگوهای به دست آمده از تأثیر هر آنزیم

1- Shaker

به دقت مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام آنالیزهای آماری مورد نظر برای محاسبه تنوع هاپلوتیپ ها یا تنوع نوکلئوتیدها و رسم درخت خویشاوندی بین افراد یا گروه ها استفاده از نرم افزارهای اختصاصی Reap و POP GENE مورد نظر قرار داشت.



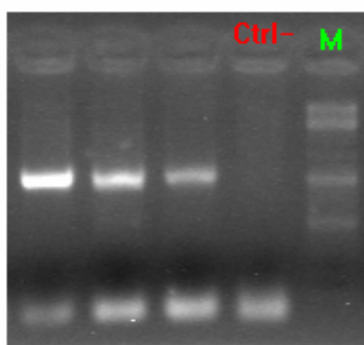
## بخش سوم : نتایج

۳-۱- ارزیابی کمیت و کیفیت DNA با استفاده از بیوفتومتر و ژل آگارز

در این پژوهش، پس از استخراج ژنوم سلول به روش فنل کلروفرم از هر نمونه بافت، کمیت DNA استخراج شده به شیوه ای که در مبحث مواد و روش ها بیان گردید، توسط دستگاه بیوفتومتر اندازه گیری شد. نمونه های DNA که دارای غلظت بیشتر از ۱/۸ و کمتر از ۲/۰ میکروگرم در میلی لیتر بودند ( $1/8 < \text{DNA} < 2/0$ )، برای حصول اطمینان بیشتر، بر روی ژل آگارز ۱ درصد (مارکر ۱۰۰ جفت بازی) نیز مورد ارزیابی کیفی قرار گرفته و نمونه های مورد تأیید، برای تهیه محصول PCR نگهداری شدند. اما نمونه های DNA که دارای غلظت خارج از دامنه فوق بودند، حذف شده و استخراج DNA مجدداً از نمونه های بافت مربوطه انجام گردید.

### ۳-۲- ارزیابی کمیت و کیفیت محصول PCR با استفاده از ژل آگارز

پس از تکثیر هر دو ژن هدف (CoI و NADH2) به وسیله واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) در هر یک از نمونه های DNA، محصول PCR در ژل آگارز ۱ درصد با استفاده از مارکر ۱۰۰ جفت بازی، با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد، محصول PCR ژن CoI تقریباً به طول ۱۰۶۰ bp، دست آمد. شکل ۳-۱ نمونه ای از محصول PCR



شکل ۳-۱- محصول PCR ژن CoI

### ۳-۳- بازهای بررسی شده در هضم آنزیمی محصول PCR ژن CoI و ژن NADH2

در این پژوهش با استفاده از ۶ آنزیم برشی تعداد ۸۷ جفت باز (از مجموع ۱۰۶۰ جفت باز) یعنی معادل ۸/۲ درصد از ناحیه ژنی CoI و با استفاده از ۷ آنزیم برشی، تعداد ۱۱۸ جفت باز (از مجموع ۱۴۵۰ جفت باز) یعنی معادل ۸/۱ درصد از ناحیه ژنی ND2 به طور مستقیم بررسی گردید. به این ترتیب جمعاً با استفاده از ۱۳ آنزیم برشی (۴ آنزیم برای هر دو ژن مشترک بود)، برای هضم آنزیمی دو ژن میتوکندریایی CoI و ND2 در ماهی سوکلا، تعداد ۲۰۵ جفت باز (از مجموع ۲۵۱۰ جفت باز) مورد بررسی قرار گرفت (معادل ۸/۳ درصد از نواحی ژنی مورد بررسی). جدول ۱-۳، کد شناسایی هر آنزیم بر روی توالی ژن مورد هضم و محل برش ژن توسط هر آنزیم را نشان می دهد. همچنین در این جدول، تعداد باز مورد شناسایی توسط هر آنزیم، تعداد محل های برش توسط هر آنزیم در هر یک از دو ژن CoI و ND2، تعداد باز مورد بررسی در هضم آنزیمی محصول PCR هر یک از دو ژن فوق و نیز تعداد کل بازهای بررسی شده در این تحقیق نشان داده شده است. همان طور که در این جدول مشاهده می گردد، تعداد بازهایی که به طور مستقیم مورد بررسی قرار گرفته اند، با توجه به تعداد باز مورد شناسایی و تعداد محل های برش توسط هر آنزیم محاسبه شده است.

جدول ۱-۳- باز کد شناسایی و محل های برش، تعداد باز مورد شناسایی، تعداد محل های برش و تعداد بازهای مورد بررسی در هضم آنزیمی محصول PCR هر یک از دو ژن CoI و ND2 و نیز تعداد کل بازهای مورد بررسی در هضم آنزیمی دو ژن فوق

ردیف	نام آنزیم	باز کد شناسایی و محل برش	تعداد باز مورد شناسایی	تعداد محل های برش		تعداد باز مورد بررسی در هضم آنزیمی محصول PCR		تعداد کل بازهای مورد بررسی در هضم آنزیمی محصول PCR دو ژن فوق
				ND2	CoI	ND2	CoI	
۱	<i>ApoI</i>	/AATT TTAA/	۴	۲	۲	۸	۸	۱۶
۲	<i>BsrI</i>	ACTGGN/ TGAC/CN	۶	۳	۲	۱۸	۱۲	۳۰
۳	<i>HaeIII</i>	GCGC/ /CGCG	۴	۳	۴	۱۲	۱۶	۲۸
۴	<i>MboII</i>	GAAGA(N)/ CTTCT(N)/	۶	۵	۵	۳۰	۳۰	۶۰
۵	<i>AluI</i>	AG/CT TC/GA	۴	۱	-	۴	-	۴
۶	<i>ScrFI</i>	CC/NGG GGN/CC	۵	۳	-	۱۵	-	۱۵
۷	<i>AseI</i>	AT/TAAT TA/ATTA	۶	-	۳	-	۱۸	۱۸
۸	<i>RsaI</i>	GT/AC CA/TG	۴	-	۴	-	۱۶	۱۶
۹	<i>HphI</i>	GGTGA(N)/ CCACT(N)/	۶	-	۳	-	۱۸	۱۵
تعداد کل بازهای مورد بررسی								
						۸۷	۱۱۸	۲۰۵

### ۳-۴- الگوهای بانندی حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR ژن CoI

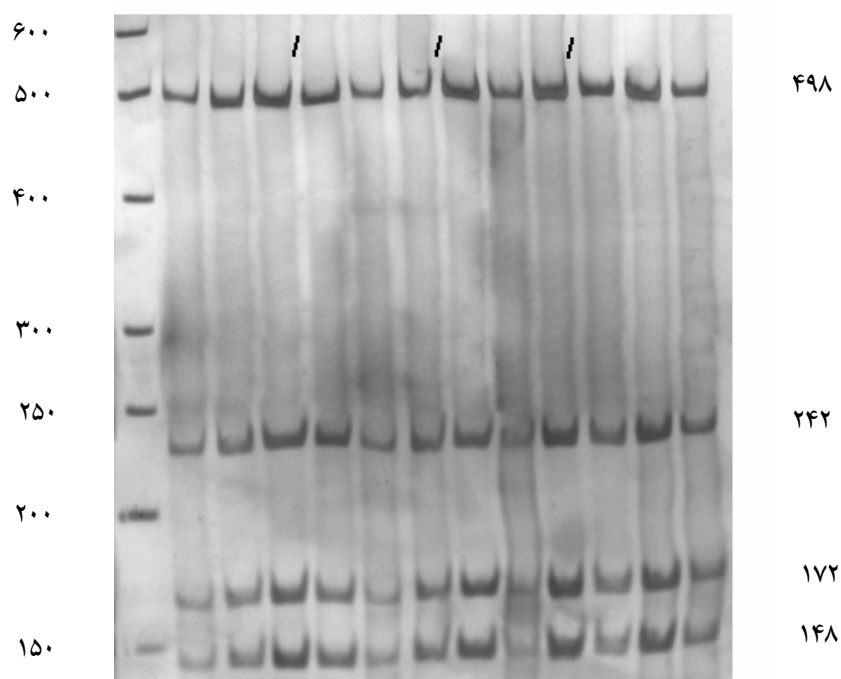
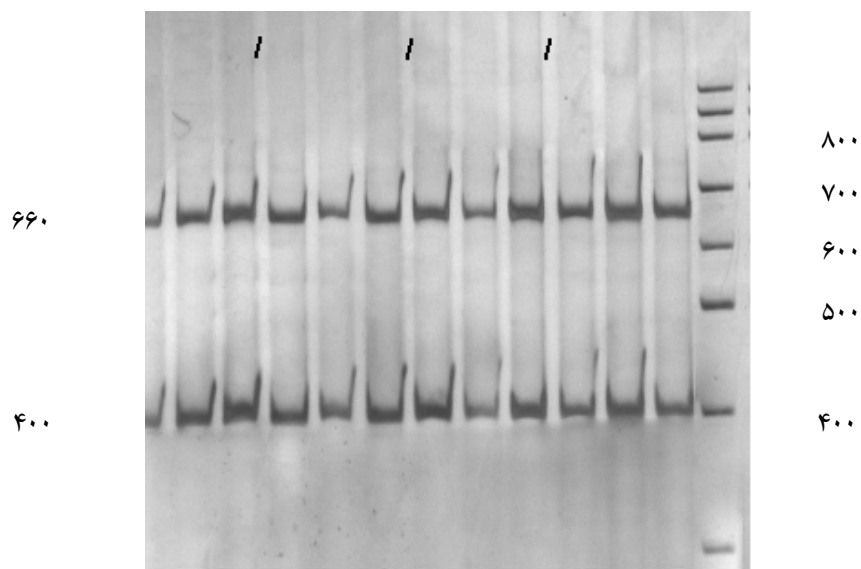
محصول PCR ژن میتوکندریایی CoI در ماهی سوکلا، حاصل از تمام نمونه های (۱۲۰ نمونه) چهار منطقه مورد مطالعه (آب های ساحلی خوزستان، بوشهر، سیستان و بلوچستان، هرمزگان) توسط ۶ آنزیم *ApoI*، *BsrI*، *AluI*، *HaeIII*، *ScrI* و *MboII* هضم گردید. جدول ۲-۳، تعداد قطعات و طول برشی آنزیمی محصول PCR ژن CoI توسط آنزیم *ApoI* که دو محل برش دارد، موجب تقسیم ژن CoI به سه قطعه شده است. آنزیم *AluI* که یک محل برش دارد، ژن CoI را به دو قطعه تقسیم نموده است. همچنین آنزیم های *BsrI*، *HaeIII* و *ScrI* که هر کدام دارای سه محل برش می باشند، موجب تقسیم ژن CoI به چهار قطعه گردیده اند. آنزیم *MboII* نیز که ۵ محل برش دارد، ژن CoI را به شش قطعه تقسیم کرده است.

جدول ۲-۳- تعداد قطعات و طول هر قطعه حاصل از تأثیر هر یک از آنزیم های مورد استفاده در هضم آنزیمی محصول PCR ژن میتوکندریایی COI در ماهی سوکلا در هر چهار منطقه مورد مطالعه

<i>ApoI</i>		<i>AluI</i>	
تعداد قطعات	طول هر قطعه (bp)	تعداد قطعات	طول هر قطعه (bp)
	۶۶۰		۶۳۰
۲	۴۰۰	۳	۳۷۲
			۱۰۳
<i>HaeIII</i>		<i>BsrI</i>	
تعداد قطعات	طول هر قطعه (bp)	تعداد قطعات	طول هر قطعه (bp)
	۶۷۰		۴۱۸
۴	۱۳۲	۴	۲۳۹
	۱۳۲		۲۲۳
	۱۲۶		۱۸۰
<i>ScrI</i>		<i>MboII</i>	
تعداد قطعات	طول هر قطعه (bp)	تعداد قطعات	طول هر قطعه (bp)
	۴۹۸		۲۸۵
	۲۴۲		۲۱۸
۴	۱۷۲	۶	۱۶۰
	۱۴۸		۱۴۷
			۱۲۲
			۷۳

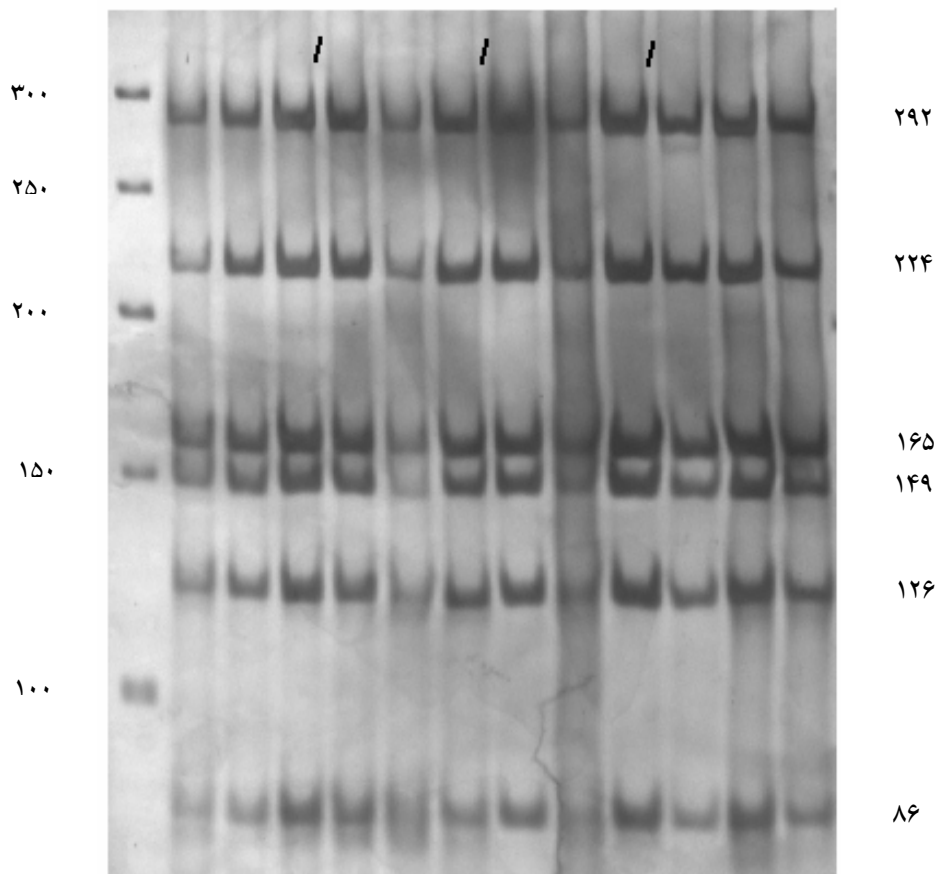
در این پژوهش، الگوهای باندهای حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR ژن CoI در تمام نمونه ها هم شکل (مونومورف) بوده و چند شکلی (پلی مورفیزم) مشاهده نگردید. شکل های ۲-۳ تا ۷-۳، الگوهای

هم شکل حاصل از هضم محصول PCR ژن CoI توسط آنزیم های فوق الذکر مربوط به سه نمونه از هر چهار منطقه مورد بررسی را نشان می دهند.

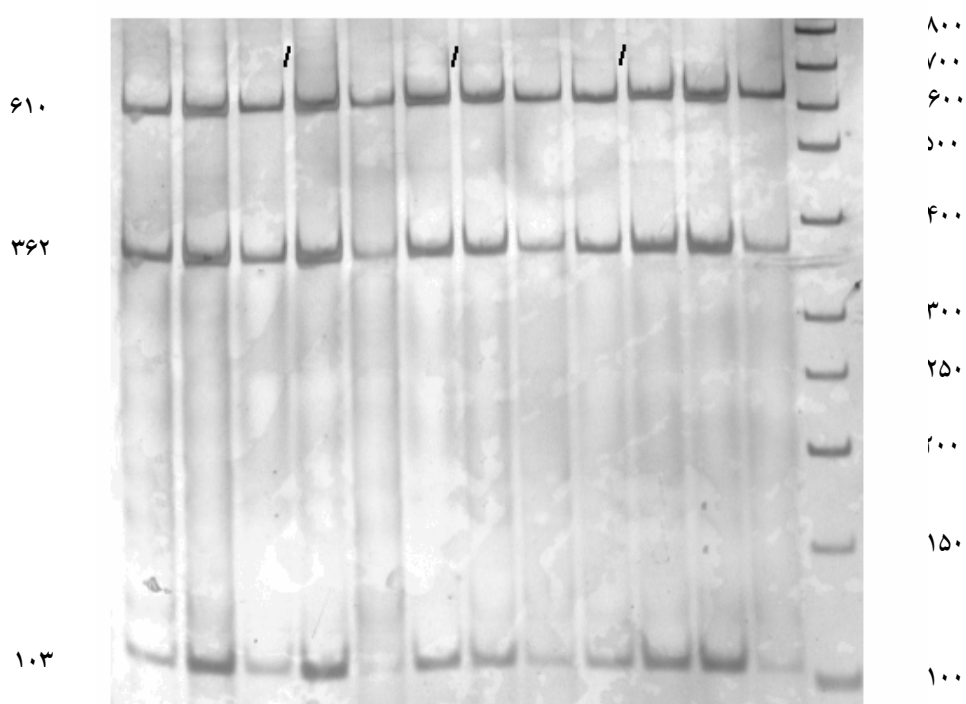


شکل ۳-۳- الگوی بانندی حاصل از هضم محصول PCR ژن CoI توسط آنزیم *SrfI* مربوط به سه نمونه از چهار منطقه مورد مطالعه





شکل ۳-۶- الگوی بانندی حاصل از هضم محصول PCR ژن CoI توسط آنزیم *MboII* مربوط به سه نمونه از چهار منطقه مورد مطالعه



شکل ۳-۷- الگوی بانندی حاصل از هضم محصول PCR ژن CoI توسط آنزیم *ApoI* مربوط به سه نمونه از چهار منطقه مورد مطالعه

### ۳-۵- الگوهای بانندی حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR ژن NADH2

در این پژوهش، محصول PCR ژن میتوکندریایی NADH2 در ماهی سوکلا، حاصل از تمام نمونه های (۱۲۰ نمونه) چهار منطقه مورد مطالعه (آب های ساحلی خوزستان، بوشهر، سیستان و بلوچستان، هرمزگان) توسط آنزیم های برشی *ApoI*، *BsrI*، *AseI*، *HaeIII*، *RsaI*، *HphI* و *MboII* هضم گردید. در جدول ۳-۳، تعداد قطعات و طول هر قطعه حاصل از تأثیر هر آنزیم در ژن ND2، نشان داده شده است.

جدول ۳-۳- تعداد قطعات و طول هر یک قطعه حاصل از تأثیر هر یک از آنزیم های مورد استفاده در هضم آنزیمی محصول PCR ژن میتوکندریایی NADH2 در ماهی سوکلا در هر چهار منطقه مورد مطالعه

<i>ApoI</i>		<i>BsrI</i>	
تعداد قطعات	طول هر قطعه (bp)	تعداد قطعات	طول هر قطعه (bp)
۳	۹۵۰	۳	۶۱۴
	۳۸۶		۳۹۵
	۱۱۴		۳۸۸
<i>HphI</i>		<i>AseI</i>	
تعداد قطعات	طول هر قطعه (bp)	تعداد قطعات	طول هر قطعه (bp)
۴	۵۶۲	۴	۹۳۶
	۳۵۰		۱۴۴
	۲۴۶		۱۴۱
	۱۴۲		۷۹
<i>RsaI</i>		<i>HaeIII</i>	
تعداد قطعات	طول هر قطعه (bp)	تعداد قطعات	طول هر قطعه (bp)
۵	۵۴۶	۵	۴۴۸
	۳۲۴		۴۴۷
	۲۸۴		۲۱۲
	۹۴		۱۳۶
	۵۲		۵۷
<i>MboII</i>			
تعداد قطعات	طول هر قطعه (bp)		
۶	۶۱۲		
	۲۳۴		
	۱۶۵		
	۱۲۵		
	۱۱۱		
	۵۲		

همان طور که این جدول نشان می دهد، هضم آنزیمی محصول PCR ژن ND2، توسط آنزیم های *ApoI* و *BsrI* که هر کدام دو محل برش دارند، موجب تقسیم این ژن به سه قطعه گردیده است. همچنین



آنزیم های *AseI* و *HphI* که هر کدام دارای سه محل برش می باشند، موجب تقسیم ژن ND2 به چهار قطعه شده اند. آنزیم های *HaeIII* و *RsaI* نیز که هر کدام چهار محل برش دارند، موجب تقسیم این ژن به پنج قطعه شده و آنزیم *MboII* با پنج محل برش، این ژن را به شش قطعه تقسیم نموده است.

الگوهای بانندی حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR ژن ND2 نیز توسط هر ۷ آنزیم مورد استفاده، در تمام نمونه ها هم شکل بوده و چند شکلی نشان ندادند.

## بخش چهارم : بحث

#### ۴-۱- اشاره ای بر اهمیت بررسی تنوع ژنتیکی در آبزیان

برنامه های آبرزی پروری آینده باید بر اساس شناخت جمعیت های ژنتیکی متفاوت موجود در طبیعت انجام گردد (Bouchon et al., 1994). شناخت منابع ژنتیکی موجود در بین گونه ها می تواند برای طراحی برنامه های اصلاح نژاد در آینده مفید باشد. به عنوان مثال بعضی از جمعیت ها ممکن است از تنوع ژنتیکی خوبی برخوردار بوده و برای آمیزش با جمعیت های پرورشی و اهلی موجود، مفید باشند (Gross et al., 2002). اولین مرحله تدوین استراتژی مدیریت ذخایر آبزیان در منابع آبی، مشخص شدن ساختار ژنتیکی جمعیت های در حال بهره برداری می باشد. این استراتژی در صورتی که بر پایه روش های قوی و دقیق مولکولی باشد، می تواند علاوه بر حفظ تنوع زیستی، میزان برداشت را به بیشترین مقدار معقول برساند (Thai et al., 2006).

#### ۴-۲- اشاره ای بر دلایل انتخاب گونه و روش PCR-RFLP

با توجه به اهمیت ماهی سوکلا (مراجعه به بخش اول) و برنامه سازمان شیلات ایران برای تکثیر مصنوعی این گونه، مدیریت این ذخایر ضروری می باشد و به این منظور اولین گام، شناسایی ساختار جمعیت این ماهی در آب های جنوبی کشور است که برای انتخاب مولد به منظور تکثیر مصنوعی نیز از اهمیت قابل توجهی برخوردار است. زیرا ماهیان مولد مورد نیاز باید از بین جمعیت هایی انتخاب شوند که تنوع ژنتیکی در آنها قبلاً تعیین شده و از کمیت و گستردگی مناسبی برخوردارند (Bouchon et al., 1994). به علاوه همان گونه که گفته شد مطالعات جمعیت و بررسی پلی مورفیسم در ماهی سوکلا به طور کلی از پیشینه مطالعاتی چندانی برخوردار نمی باشد، به طوری که تنها پژوهش انجام شده در ایران توسط سالاری و همکاران در سال ۱۳۸۷ و با روش ریزماهواره انجام شده است و در خارج از کشور نیز فقط سه پژوهش در این ارتباط یافت گردید که دو پژوهش با روش ریزماهواره (Pruett et al., 2005; Renshaw et al., 2005) و پژوهش دیگر با دو روش RAPD و RFLP (Liu et al., 2005) انجام گردیده است. لذا می توان گفت که این پژوهش برای اولین بار به بررسی پلی مورفیسم در ماهی سوکلا به روش PCR-RFLP که روشی با قدرت تفکیک زیاد برای انجام مطالعات مولکولی درون گونه می باشد (Bouchon et al., 1994)، پرداخته است.

#### 4-3- مقایسه تعداد باز مورد بررسی در مطالعات مشابه

در بررسی حاضر، تعداد ۲۵۰ جفت باز (۸/۳ درصد از نواحی ژنی مورد مطالعه) با استفاده از آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. قطب رزمجو و همکاران نیز (۱۳۸۷)، که در بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت گاو ماهی خزری *Neogobius caspius* موفق به مشاهده چند شکلی نگردیدند، تعداد ۱۰۲ جفت باز (تقریباً ۱۵ درصد از سه ژن مورد مطالعه) را با استفاده از ۲۱ آنزیم مورد مطالعه قرار دادند. همچنین لالویی و همکاران در سال ۱۳۸۲، با بررسی ۱۱۲ جفت باز (۹۵ درصد از ژن سیتوکروم b یا حدود ۱ درصد از ژنوم میتوکندری) و استفاده از ۱۰ آنزیم در جمعیت ماهی *Barbus capito* در حوزه جنوبی خزر موفق به مشاهده چند شکلی نشدند. عطایی و همکاران نیز که در سال ۱۳۸۱ بخش کوچکی از مولکول DNA (۴۱ جفت باز) را با استفاده از ۲۴ آنزیم به منظور بررسی تنوع ژنتیکی در تاسماهی ایرانی *Acipenser persicus* مورد مطالعه قرار دادند، چند شکلی را مشاهده نمودند. به طوری که ملاحظه می گردد، تعداد باز مورد بررسی در مطالعات فوق از ۴۱ جفت باز در تاسماهی ایرانی (عطایی و همکاران، ۱۳۸۱) تا ۲۰۹ جفت باز در ماهی سوکلا (بررسی حاضر)، متغیر بوده و در هیچ یک از آنها چند شکلی مشاهده نگردیده است.

#### 4-4- مقایسه الگوی بانندی هضم آنزیمی محصول PCR نمونه ها در این بررسی با الگوی بانندی مورد انتظار بر اساس بانک جهانی ژن (ژن بانک)

از آنجا که پژوهش دیگری برای بررسی تنوع ژنتیکی در ماهی سوکلا با روش PCR-RFLP انجام نشده است، لذا مقایسه الگوی بانندی حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR نمونه های مورد بررسی، فقط با الگوی بانندی مورد انتظار در صورت هضم آنزیمی توالی گزارش شده برای ژن CoI در ژن بانک انجام گردید. در این بررسی اگرچه الگوی بانندی حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR ژن CoI با تمام آنزیم های مورد استفاده در تمام مناطق هم شکل بودند، اما تفاوت هایی را با ژن بانک نشان دادند. به عنوان مثال، طبق توالی نوکلئوتیدی ژن CoI موجود در بانک جهانی ژن که طراحی پرایمر بر آن اساس انجام شده بود، انتظار می رفت که طول محصول PCR در این بررسی ۱۰۰۱ جفت باز باشد، در حالی که تقریباً در تمام موارد

۱۰۶۰ جفت باز به دست آمد. به علاوه طول قطعات حاصل از هضم آنزیمی نیز با الگوی مورد انتظار برای توالی نوکلئوتیدی موجود در بانک جهانی ژن متفاوت بود. آشکارترین تفاوت مربوط به آنزیم *AluI* بود که در توالی ژن COI موجود در بانک جهانی ژن، دارای دو محل برش بوده و سه قطعه ایجاد می گردد، اما در این بررسی دارای یک محل برش بوده و دو قطعه ایجاد نمود (مقایسه جداول ۲-۹ و ۳-۲). البته اگر چه وجود تفاوت در الگوی بانندی حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR نمونه های مورد مطالعه در این بررسی، با الگوی بانندی ژن COI در ژن بانک دور از انتظار نمی باشد، زیرا نمونه های مورد استفاده در این بررسی و نمونه هایی که اطلاعات آن در ژن بانک درج گردیده، احتمالاً از دو جمعیت متفاوت جمع آوری گردیده اند، اما توالی نوکلئوتیدی ژن COI متعلق به نمونه های مورد استفاده در این بررسی، قابل گزارش به بانک جهانی ژن می باشد. طول قطعات مورد انتظار حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR ژن ND2 (۱۴۵۰ bp) نیز، با طول قطعات مورد انتظار حاصل از هضم آنزیمی ژن ND2 موجود در ژن بانک (۱۲۹۹ bp) متفاوت بود.

#### ۴-۵- تفسیر مطالعات انجام شده در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی در ماهی سوکلا

سالاری و همکاران در سال ۱۳۸۷، تنوع ژنتیکی ۱۸۴ نمونه ماهی سوکلا از سواحل هرمزگان، سیستان و بلوچستان و بوشهر را با روش ریزماهواره مورد مطالعه قرار دادند و از ۱۰ جفت پرایمر مورد استفاده، در ۷ جفت چند شکلی مشاهده نموده و سه جمعیت مجزا در سه منطقه فوق گزارش کردند. آنها دامنه هتروزیگوسیتی<sup>۱</sup> مشاهده شده (H<sub>o</sub>) بین مناطق نمونه برداری در هفت لوکوس چند شکل را بین ۰/۱۵ تا ۱ با میانگین ۰/۶۵۵ و کمتر از دامنه هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H<sub>e</sub>) (بین ۰/۷۶۷ تا ۰/۹۲۳ با میانگین ۰/۸۷۴) و نیز کمتر از میانگین مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده در ماهیان دریایی (۰/۷۹) گزارش کردند. به طور کلی ماهیان دریایی تنوع ژنتیکی بیشتر و اختلاف ژنتیکی کمتری نسبت به ماهیان آب شیرین نشان می دهند که دلیل آن به اندازه بزرگ جمعیت مؤثر و جریان ژنی بالا در محیط های دریایی و به عکس، جریان ژنی محدود در ماهیان آب شیرین

---

۱- هتروزیگوسیتی شاخصی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی است و اهمیت زیادی در مطالعه ساختار جمعیت گونه ها دارد. زیرا تأمین کننده دامنه وسیعی از ژنوتیپ به عنوان پاسخی به سازش پذیری در شرایط متغیر محیطی می باشد و بسیاری از خصوصیات مهم اقتصادی مثل رشد، باروری و مقاومت در برابر بیماری را تحت تأثیر قرار می دهد (Beardmore et al., 1997)؛ به نقل از سالاری و همکاران، ۱۳۸۷).

نسبت داده می شود (Norris et al., 1999).

Renshaw و همکاران (۲۰۰۵)، تنوع ژنتیکی در ۲۴ نمونه ماهی سوکلا در سواحل میسی سیپی را با استفاده از ۳۵ ریزماهواره بررسی نمودند که ۳۳ ریزماهواره چند شکلی نشان ندادند. آنها نیز متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده شده را ۰/۴۹۶ و کمتر از متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۵۶۳) و همین طور کمتر از مقدار هتروزیگوسیتی گزارش شده برای ماهیان دریایی (۰/۷۹) محاسبه نمودند. Pruett و همکاران نیز در سال ۲۰۰۵، تنوع ژنتیکی در ۴۲ نمونه ماهی سوکلا در خلیج مکزیک واقع در سواحل جنوبی ایالات متحده را با استفاده از روش ریزماهواره و ۲۰ جفت پرایمر، مورد بررسی قرار دادند و دامنه هتروزیگوسیتی مورد انتظار را بین ۰/۴۳ تا ۰/۹۱۰ (با میانگین ۰/۴۷۶) و دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده را بین ۰/۴۳ تا ۰/۹۵۷ (با میانگین ۰/۵) و کمتر از هتروزیگوسیتی ماهیان دریایی گزارش نمودند. همچنین Liu و همکاران (۲۰۰۵)، تنوع ژنتیکی ماهی سوکلا در آب های سرزمینی کشور چین را توسط دو روش RAPD (با استفاده از ۱۷ آغازگر) و RFLP (با استفاده از ۱۹ آنزیم برشی و ژن میتوکندریایی سیتوکروم b) مطالعه نمودند. آنها تنوع ژنتیکی نسبتاً بالایی را مشاهده کردند، به طوری که ۸۰/۸۵ درصد از جایگاه های ژن مورد بررسی چند شکلی نشان ندادند و فاصله ژنتیکی بین نمونه ها را ۰/۲۶۰ محاسبه نمودند و نتایج حاصله را بیانگر مناسب بودن این دو روش در مطالعات جمعیتی ماهی سوکلا دانستند.

#### ۴-۶- دلایل مطرح شده برای عدم مشاهده چند شکلی در تعدادی از مطالعات به روش PCR-RFLP

لالویی و همکاران در سال ۱۳۸۲، بررسی مولکولی جمعیت ماهی *Barbus capito* در آب های حوزه جنوبی دریای خزر را به روش PCR-RFLP انجام دادند. آنها ۶۰ نمونه باله ماهی از دریای خزر و رودخانه های استان مازندران (۱۵ نمونه از دریا و ۵ نمونه از هر یک از رودخانه های تجن، شیروود و تنکابن) و گیلان (۱۵ نمونه از دریا، ۷ نمونه از رودخانه حویق و ۸ نمونه از سفید رود) جمع آوری نمودند. در این بررسی، محصول PCR حاصل از تکثیر ژن سیتوکروم b در نمونه های ماهی *Barbus capito* به طول ۱۰۶۲ bp به دست آمد و جهت انجام RFLP، از ۱۰ آنزیم برشی استفاده گردید. آنها با توجه به الگوهای

هضم آنزیمی که برای تمام آنزیم ها و تمام نمونه های مورد استفاده یکسان بودند، تمام افراد را دارای ژنوتیپ یکسان تشخیص داده و جمعیتی قابل جداسازی مشاهده نمودند. با توجه به این که متوسط تعداد نوکلئوتیدهایی که در این بررسی مورد مطالعه قرار گرفت، حدود ۱۱۲ جفت باز بود (۹۵ درصد از ژن سیتوکروم b یا حدود ۱ درصد از کل ژنوم میتوکندری)، لذا اظهار داشتند که ژن سیتوکروم b، تنوع ژنتیکی یا چند شکلی را در بین افراد داخل یک منطقه و یا افراد بین مناطق مختلف نشان نمی دهد و احتمالاً ژن مناسبی برای مطالعه جمعیت سس ماهیان نبوده و نمی تواند اختلاف بین جمعیت ها را به خوبی نشان دهد، لذا می بایست ناحیه دیگری از ژنوم میتوکندری مثل ناحیه D-loop یا ND-5/6 مورد مطالعه قرار گیرد. آنها عدم مشاهده چند شکلی در نمونه های مورد بررسی را به نبودن موانع فیزیکی یا زیستی در رودخانه ها و دریای خزر نیز نسبت دادند که سبب فقدان تفاوت های معنی دار بین افراد گونه *Barbus capito* در مناطق مختلف نمونه برداری شده است.

قطب رزمجو و همکاران در سال ۱۳۸۷، ساختار ژنتیکی جمعیت گاو ماهی خزری *Neogobius caspius* در حوزه جنوبی خزر را به روش PCR-PFLP مورد بررسی قرار دادند. آنها تعداد ۱۳۵ نمونه گاو ماهی خزری از ۳ منطقه در طول ساحل جنوبی دریای خزر (شامل سواحل انزلی، چالوس و بندر ترکمن) جمع آوری نمودند و محصول PCR مربوط به ژن سیتوکروم اکسیداز I (CoI)، دو ژن tRNA و ناحیه D-loop ژنوم میتوکندری را حدود ۷۰۰ bp به دست آوردند و جهت انجام RFLP از ۲۱ آنزیم استفاده کردند. آنها ۱۰۲ جفت باز (تقریباً ۱۵ درصد از سه ژن مورد مطالعه) را به طور مستقیم مورد بررسی قرار دادند، لیکن الگوهای هضم آنزیمی برای تمام نمونه ها مشابه بودند و چند شکلی را در گاو ماهی خزری مشاهده ننموده جمعیت قابل جداسازی تشخیص ندادند. آنها دلایل عدم مشاهده چند شکلی در نمونه های مورد بررسی را بدین شرح توضیح دادند که ممکن است ژن مورد بررسی، ژن مناسبی برای مطالعه جمعیت گاو ماهی خزری نبوده و توالی مورد استفاده دچار هیچ گونه جهش در طی دوران تکاملی خود نگردیده است و چه بسا انتخاب ژن های دیگر، نتایج متفاوتی نشان دهند. همچنین ممکن است شرایط اکولوژیک دشواری که در دریای خزر در دو دهه اخیر روی داده و نیز اعمال فشار صید بر ذخایر توسط کشورهای حاشیه،

موجب حذف افراد جمعیت با ژنوتیپ های متفاوت گردیده و ژنوتیپ موجود به دلیل شرایط و ویژگی خاص خود، قادر به بقا و ادامه حیات در خزر باقی مانده است.

عطایی و همکاران در سال ۱۳۸۱ تنوع ژنتیکی در ۹۰ نمونه تاسماهی ایرانی *Acipenser persicus* رودخانه سفید رود و جنوب شرقی و غربی دریای خزر (ترکمن، آستارا، سفیدرود) را با استفاده از روش PCR-PFLP مورد بررسی قرار دادند. آنها ناحیه D-loop در mtDNA را با روش PCR تکثیر نموده و از ۲۴ آنزیم برشی استفاده کردند. در این بررسی، تعداد ۱۸ هاپلوتیپ تعیین گردید که فراوانی ۴ هاپلوتیپ بیشتر از سایرین و بقیه هاپلوتیپ ها نادر بودند. متوسط تنوع هاپلوتیپی،  $0.748 \pm 0.000$  و متوسط تنوع نوکلئوتیدی  $0.45 \pm 0.000$  محاسبه شد. اما توزیع هاپلوتیپ ها بین سه منطقه مورد مطالعه، تفاوت معنی داری را نشان نداد که دلیل آن ممکن است تعداد کم نمونه و نیز محل های نمونه برداری باشد. لذا برای رفع این نقیصه از شبیه سازی Monte carlo با ۱۰۰۰ بار تکرار استفاده نمودند که باز هم تفاوت معنی داری را نشان نداد. از آنجا که در این تحقیق فقط بخش کوچکی از مولکول mtDNA (۴۱ باز) مورد بررسی قرار گرفت، لذا اظهار داشتند که ممکن است مطالعه نواحی دیگر ژنوم میتوکندری، تعداد هاپلوتیپ ها را افزایش دهد. دلیل دیگر را این گونه مطرح نمودند که احتمالاً تولید مثل درون جمعیتی در هر نسل، یک بار یا بیشتر روی داده و لذا از ایجاد تنوع ژنتیکی بین جمعیت ها جلوگیری نموده است. در این مطالعه، پراکنش هاپلوتیپ ها بین نواحی مختلف، همگن بود که آن را نشان دهنده یک جریان ژنی دانستند. آنها با مقایسه نتایج حاصل از این تحقیق با سایر مطالعات انجام شده روی تاسماهیان، اظهار داشتند که سطح تنوع بین گونه ای در تمام گونه های تاسماهیان پایین است.

شعبانی در سال ۱۳۸۴، ماهیان مولد اوزون برون *Acipenser stellatus* در بخش شمالی (رودخانه ولگا) و جنوبی دریای خزر را با روش PCR-RFLP و با استفاده از ناحیه D-loop و ژن میتوکندریایی ND-5/6 مورد بررسی قرار داد و توانست جمعیت اوزون برون ولگا را از خزر جنوبی جدا کند. اما اختلاف معنی داری در بین نمونه های جمع آوری شده از نواحی مختلف خزر جنوبی مشاهده نکرد و دلیل آن را نبودن مانع جغرافیایی برای جداسازی مناطق خزر جنوبی از یکدیگر و صید ماهیان محدوده رودخانه تجن از دریا دانست.



Bouchon و همکاران در سال ۱۹۹۴، تنوع ژنتیکی در mtDNA سه سویه *Penaeus monodon* Fabricus در مالزی، استرالیا و فیجی و جمعیت پرورشی *Penaeus japonicus* Bate را به روش PCR-RFLP مورد مطالعه قرار دادند. آنها برای هضم آنزیمی mtDNA در *Penaeus monodon* Fabricus از ۱۲ آنزیم برشی و در *Penaeus japonicus* Bate از ۵ آنزیم برشی استفاده کردند. الگوی هضم ۹ آنزیم از ۱۲ آنزیم مورد استفاده در *Penaeus monodon* Fabricus، در مورد تمام نمونه ها هم شکل بودند و فقط ۳ آنزیم چند شکلی را نشان دادند که البته الگوی هضم این ۳ آنزیم در مورد نمونه های مالزی و استرالیا با یکدیگر هم شکل بوده ولی با فیجی اختلاف داشتند. آنها تنوع ژنتیکی بین سویه فیجی و دو سویه استرالیا و مالزی را با توجه به نتایج حاصل از PCR-RFLP و با استفاده از روش Nei و Tajima (۱۹۸۱)، معنی دار و  $1/68$  درصد محاسبه نمودند. هضم آنزیمی mtDNA در جمعیت *Penaeus japonicus* Bate چند شکلی نشان نداد که دلیل آن را جمع آوری نمونه ها از میان میگوهای مولدی که در استخرهای پرورشی بودند و نه در جمعیت های طبیعی گزارش کردند. این امر، اهمیت انتخاب مولد از بین جمعیت هایی را نشان می دهد که دارای تنوع ژنتیکی گسترده هستند و تنوع ژنتیکی در آنها قبلاً تعیین شده است. میانگین تنوع ژنتیکی بین دو گونه را نیز  $13/9 \pm 3/4$  به دست آوردند. در این بررسی تنوع ژنتیکی بین جمعیت فیجی و جمعیت های مالزی و استرالیا معنی دار (تقریباً  $1/7$  درصد) گزارش گردید. تنوع ژنتیکی بین دو گونه برای ژن 12S rDNA،  $8/7 \pm 3/7$  درصد و برای ژن 16S rDNA،  $24/0 \pm 6/6$  درصد محاسبه گردید.

#### ۴-۷- جمع بندی

در این تحقیق، الگوی بانندی حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR دو ژن CoI و ND2 در تمام نمونه ها و مناطق مورد مطالعه یکسان بودند و هیچ گونه چند شکلی نشان ندادند. بررسی مطالعات مولکولی جمعیت در آبزیان مختلف به روش PCR-RFLP نشان داد که غالباً نامناسب بودن ژن، به عنوان یکی از عوامل عدم مشاهده تنوع ژنتیکی گزارش گردیده است. ممکن است در این بررسی نیز دو ژن CoI و ND2 برای نشان دادن چند شکلی در ماهیان سوکلای سواحل

شمالی خلیج فارس و دریای عمان مناسب نبوده اند، این امکان نیز وجود دارد که در نمونه های مورد مطالعه واقعاً چند شکلی وجود نداشته است. البته بدیهی است استفاده از تعداد نمونه ها و آنزیم های بیشتر و نیز سایر نواحی ژنی می تواند نتایج دقیق تری را نشان دهد. متأسفانه مطالعات مولکولی دیگری در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی ماهی سوکلا در خلیج فارس و دریای عمان با روش PCR-RFLP وجود ندارد که بتوان اطلاعات حاصله را با آن مقایسه نمود و تحلیل دقیق تری ارائه داد.

Kohlmann و همکاران (۲۰۰۳)، عدم تنوع ژنتیکی و یا کاهش قابل توجه آن بین افراد را در مناطقی گزارش نموده اند که امکان مهاجرت و جابجایی ماهیان از منطقه ای به منطقه دیگر (جریان ژنی) وجود دارد. ماهی سوکلا نیز از گروه ماهیان مهاجر است که به دلیل عدم وجود موانع فیزیکی و زیستی می تواند در سراسر خلیج فارس و دریای عمان مهاجرت نماید و به عبارت دیگر جریان ژنی بین تمام مناطق برقرار نماید. لذا عدم مشاهده چند شکلی در نمونه های مورد بررسی در مطالعه حاضر، ممکن است ناشی از مهاجر بودن این ماهی بوده و چندان دور از واقعیت نباشد. زیرا به طور کلی مهاجرت زیاد در ماهیان و وجود پراکنش بالا که احتمالاً ناشی عدم وجود موانع فیزیکی یا اکولوژیک برای ماهیان است، از جدایی ژنتیکی جمعیت ها جلوگیری می کند (Waples, 1987). همان طور که گفته شد سالاری و همکاران (۱۳۸۷) نیز میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده بین مناطق نمونه برداری را (۰/۶۵۵)، کمتر از میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۸۷۴) و نیز کمتر از میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در ماهیان دریایی (۰/۷۹) محاسبه نمودند.

اما از سوی دیگر، Kohlman و همکاران (۲۰۰۳)، پراکنش جمعیت ها در نواحی مختلف را تحت تأثیر عوامل مختلف فیزیکی و اکولوژیک نیز دانسته اند، لذا اگرچه ماهی سوکلا از گروه ماهیان مهاجر است، اما با توجه به تفاوت های نسبی محیطی (به ویژه دما و شوری) که در مناطق مختلف خلیج فارس و دریای عمان وجود دارد، این امکان نیز هست که گروه های ژنتیکی متفاوتی از این گونه در سواحل شمال شرقی و شمال غربی خلیج فارس و دریای عمان وجود داشته باشند. به علاوه جریان ژنی و فاصله جغرافیایی با یکدیگر نسبت معکوس دارند (Barber et al., 1999). بنابراین ممکن است جریان ژنی بین نمونه های مناطق خلیج فارس با یکدیگر و دریای عمان با یکدیگر، کم تر از جریان ژنی بین نمونه های

مناطق خلیج فارس و دریای عمان با یکدیگر باشد. سالاری و همکاران (۱۳۸۷) نیز، بیشترین فاصله ژنتیکی و کمترین شباهت ژنتیکی را میان نمونه های بوشهر و سیستان و بلوچستان گزارش کردند. همچنین کمترین فاصله ژنتیکی و بیشترین شباهت ژنتیکی را میان نمونه های بندر عباس و بندر لنگه مشاهده نمودند که با فاصله جغرافیایی آنها هماهنگی دارد و دلیل آن را به عوامل زیست محیطی مختلف مانند تفاوت دما، شوری، مواد مغذی و جریانات دریایی بین زیستگاه های مختلف در شرق و غرب خلیج فارس و دریای عمان نسبت دادند. بنابراین تفاوت عوامل زیست محیطی موجود بین زیستگاه های شرق و غرب خلیج فارس و دریای عمان ممکن است بتواند موجب محدودتر شدن جریان ژنی بین آنها و ایجاد تنوع ژنتیکی گردد. بدیهی است اظهار نظر قطعی در این زمینه، مستلزم انجام مطالعات بیشتر است.

## پیشنهادهای

نظر به اهمیت اقتصادی و تجاری ماهی سوکلا (مراجعه به بخش اول) و نیز برنامه سازمان شیلات ایران برای تکثیر مصنوعی این گونه که مستلزم آگاهی از ساختار جمعیت آن می باشد، موارد ذیل پیشنهاد می گردد:

- ۱- استفاده از سایر روش های مولکولی با تعداد نمونه بیشتر
- ۲- استفاده از روش PCR-RFLP با سایر ژن ها و افزایش تعداد نمونه و آنزیم مورد استفاده
- ۳- نمونه برداری از ماهیان سوکلا در سواحل جنوبی خلیج فارس و دریای عمان و بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت های موجود آن
- ۴- مقایسه جمعیت ماهی سوکلا در سواحل شمالی و جنوبی خلیج فارس و دریای عمان
- ۵- معرفی جمعیت های برخوردار از تنوع ژنتیکی قابل قبول، به منظور انتخاب مولد جهت تکثیر و تولید بچه ماهی

## منابع فارسی

- امتیازی، گ. و م. کریمی، ۱۳۸۵. مبانی زیست مولکولی و مهندسی ژنتیک، چاپ هفتم، انتشارات مانی، ۴۹۰ ص.
- امتیازی، گ.، ۱۳۸۶. مبانی زیست مولکولی و مهندسی ژنتیک به همراه تولید پروتئین های نو ترکیب، انتشارات مانی، ۵۴۸ ص.
- ایزدی، ع. و ک. بشارت، ۱۳۸۵. معرفی زمینه های سرمایه گذاری در زیربخش شیلات: پرورش ماهیان دریایی در قفس، سازمان شیلات ایران معاونت اداری و برنامه ریزی دفتر طرح و توسعه، ۱۰ صفحه.
- امیدی، م. و ع. عالیشاه، ۱۳۸۵. روش های عملی دورگه سازی DNA در محل، تألیف شوارزخر، ت. و پ. ه. هریسون، انتشارات دانشگاه تهران، ۳۳۹ ص.
- دقوقی، ب.، ۱۳۸۵. بررسی برخی از ویژگی های زیستی ماهی سوکلا *Rachycentron canadum* گزارش نهایی طرح تحقیقاتی، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان،
- سالاری علی آبادی، م.، رضوانی گیل کلایی، س.، سواری، ا.، ذوالقرنین، ح. و نبوی، س. م. ب.، ۱۳۸۷. مقایسه ژنتیکی جمعیت های ماهی سوکلای (*Rachycentron canadum*) خلیج فارس و دریای عمان با استفاده از روش میکروستلایت، مجله شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر، سال دوم، شماره ۱: ۹-۱۷.
- شعبانی، ع.، ۱۳۸۴. مقایسه جمعیت های مولدین ماهی اوزون برون *Acipenser stellatus* در بخش شمالی (رودخانه ولگا) و جنوبی دریای خزر را با روش های مولکولی PCR-RFLP مورفولوژیکی و برخی از نرماتیه های تکثیر آن. پایان نامه دکتری شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ۱۲۰ ص.
- عطایی، ف.، حسن زاده کیابی، ب.، پورکاظمی، م.، شیدایی، م. و پازوکی، ج.، ۱۳۸۱. بررسی تنوع ژنتیکی تاسماهی ایرانی *Acipenser persicus* در رودخانه سفید رود با روش مولکولی

PCR-RFLP روی mtDNA و اطلاعات مورفولوژیکی، پایان نامه کارشناسی ارشد علوم جانوری، دانشکده علوم دانشگاه شهید بهشتی، ۱۵۶ ص.

فرازمند، ع.، علیزاده، ز. و فاتحی، م.، ۱۳۸۵. ژنتیک: راهنمای آزمایشگاه: تألیف مرتنز، ت.آر. و همراسمیت، آر. ال.، ۲۰۰۱، مرکز نشر دانشگاهی، ۳۰۰ ص.

قطب رزمجو، ا.، رضوانی، س.، قوام مصطفوی، پ.، فاطمی، س.م.ر. و پورکاظمی، م.، ۱۳۸۷. بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت گاو ماهی خزری *Neogobius caspius* در حوزه جنوبی خزر به روش PCR-PFLP، مجله شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر، سال دوم، شماره ۳: ۲۱-۲۶.

لالویی، ف.، رضوانی گیل کلایی، س.، فاطمی، س.م.ر. و تقوی، م.ج.، ۱۳۸۷. بررسی ژنتیک جمعیت ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) حوزه جنوبی دریای خزر با استفاده از mtDNA (PCR-PFLP)، مجله علمی شیلات ایران، موسسه تحقیقات شیلات ایران، سال هفدهم، شماره ۲: ۸۹-۱۰۱.

لالویی، ف.، رضوانی، س. و پورکاظمی، م.، ۱۳۸۲. بررسی مولکولی جمعیت ماهی *Barbus capito* در آب های حوزه جنوبی دریای خزر به روش PCR-PFLP، مجله علمی شیلات ایران، موسسه تحقیقات شیلات ایران، سال دوازدهم، شماره ۱: ۱۱۷-۱۳۰.

نقوی، م. ر.، ب. قره یاضی و ق. حسینی سالکده، ۱۳۸۶. نشانگرهای مولکولی، چاپ دوم، انتشارات دانشگاه تهران، ۳۳۴ ص.

هاشمی، م.، رنجی، ن. و انتظاری، م.، ۱۳۸۹. آنالیز ژن و ژنوم، تألیف ر. جی. ریس، انتشارات خانه زیست شناسی، ۴۳۹ ص.

یزدی صمدی، ب. و ولیزاده، م.، ۱۳۸۰. ژنتیک از دیدگاه مولکولی، انتشارات دانشگاه تهران، ۴۴۲ ص.

## منابع انگلیسی

- Arnold, C.R., Kaiser, J.B., Holt, G.J., 2002. Spawning of Cobia *Rachycentron canadum* in captivity, J. World Aquac. Soc., 33: 205-207.
- Avise, J. C., 1994. Molecular markers, Natural history and evolution. Chapman and Hall, New York.
- Benetti, D. D., Sardenberg, B., Welch, A., Hoenig, R., Orhun, M.R. and Zink, L. 2008. Intensive larval husbandry and fingerling production of Cobia *Rachycentron canadum* , Aquaculture, 281: 22-27.
- Benetti, D. D., Orhun, M. R., O'ttanlon, B. Zink, L., Cavalin, F. G., Sardenberg, B., Palmer, K., Denlinger, B., Bacoat, D., 2007. Aquaculture of Cobia (*Rachycentron canadum*) in the Americas and the Caribbean. In: Liao, I. C., Leano, E. M. (Eds.), Cobia Aquaculture: Research, Development and commercial production. Asian Fisheries Society, Manilla, Philippines, World Aquaculture Society, Louisiana, USA, The Fisheries Society of Taiwan, Keelung, Taiwan, and National Taiwan Ocean University, Keelung, Taiwan, 57-77.
- Benzie, J. A., Ballment, E., Forbes, A. T., Demetriades, N. T., Sugama, K., and moria, S., 2002. Mitochondrial DNA Variation in Indo-Pacific populations of the giant tiger prawn, *penaeus monodon*, Molecular Ecology, 2553–2569.
- Billington, N., 2003. Mitochondrial DNA. E.M. Hallerman (Ed.), population genetics: American Fisheries society, Bethesda, Maryland: 59–100.
- Billington, N., and Hebert, P. D. N., 1991. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions, Can. J. Fish. Aquat. Sci., 48: (suppl. 1).
- Birky, C. W., maruyama, T., Fuerst, P., 1983. An approach to Population and Evolutionary genetic theory for genes in mitochondrial and chloroplast and some results. Genetics, 103: 513-527.
- Birky, C. W., Fuerst, P. and Maruyama, T., 1989. Organelle gane diversity under migration, mutation and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effect of heteroplasmic cells and comparison to nuclear genes, Genetics, 121: 613–627.
- Bouchon, D., Souty-Grosset, C. and Raimond, R., 1994. Mitochondrial DNA variation and markers of species identity in two Penaeid shrimp species: *Penaeus monodon* Fabricus and *P. japonicus* Bate, Aquaculture, 127: 131–144.

Beardmore, J. A., Mair, G. C. and Lewis, R. I., 1997. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture, *Aquaculture Research*, 28: 829– 839.

Briggs, J. C., 1960. Fishes of worldwide (circumtropical) distribution. *Copeia*, 171-180.

Brown, T. A., 2007. *GENOMES 3*, Garland Science Publishing, USA,

Brown, W. M., Prager, E.M., Wang, A., and Willson, A.C., 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution, *Journal of molecular evolution*, 18: 225–239.

Brown, W. M., 1985. The mitochondrial genome of animals. In: MacIntyre, R. J., Editor, 1985. *Molecular Evolutionary Genetics*, Plenum, New York, 95– 30.

Brown, W. M., Gerge, M. J., and willson, A. C., 1979. Rapid evolution of mtDNA.. *Acad. Sci. USA*,. 76: 1467–1971.

Boudry, P., Heurtebise, S. and Lap  gue, S., 2003. Mitochondrial and nuclear DNA sequence variation of presumed *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata* specimens: a new oyster species in Hong Kong?. *Aquaculture*, 228: 15–25.

Chang, Y. S., Hung, F. L., and Lo, T. B., 1994. The complete nucleotide sequence and gone organization of *cyprinus carpio* mitochondrial genom. *Journal Mol.*, 38 : 138–155.

Chang, S. L., Hsieh, C. S., Chao, Z. L., Su, M. S., 1999. The introduction of breeding and culture of Cobia. *Fish World*, 270: 14-26 .

Chen, J. T. F., 1986. A synopsis of vertebrates in Taiwan, Vol. II. The commercial press, Taiwan. 506 pp.

Chow, S., Clarke, M. E., and Walsh, P. J., 1993. PCR–RFLP analysis on thirteen western Atlantic snappers (subfamily Lutjaninae): a simple method for species and stock identification. *Fish. Bull.*, 91: 619–627.

Chow, S., 1994. Identification if Billfish species using mitochondrial cytochrome b gene fragment amplified by polymerase chain reaction. Report of the 2<sup>nd</sup> international commission for the conservation of Atlantic Tunas Billfish workshop. ICCAT XLI, 549- 560, Miami, Florida.

Chow, S., Okamoto, H., Uozumi, Y., Takeuchi, Y. and Takeyama H., 1997. Genetic stock structure of the swordfish (*Xiphias gladius*) inferred by PCR-RFLP analysis of the mitochondrial DNA control region, *Marine Biology*, 127: 359- 367.

Cordes, J. F., Armknecht, S. L., Starkey, E. A. and Graves, J. E., 2001. Forensic identification of sixteen species of Chesapeake bay sportfishes using mitochondrial DNA restriction fragment- length polymorphism (RFLP) analysis, *Estuaries*, 24: 49-58.

Çiftçi, Y. and Okumuş, İ., 2002. Fish population genetics and application of molecular markers to fisheries and aquaculture- I: Basic principles of fish population genetics. *Turkish Journal fisheries and aquatic sciences*, 2: 145–155.

Crosetti, D., Avise, J.C., Placidi, F., Rossi, A. R. and Sola, L., 1993. Geographic variability in the grey mullet *Mugil cephalus* : preliminary results of mtDNA and chromosome analyses, *Aquaculture*, 111: 95–101.

Daley, W. J., 1993. The use of fish hatcheries: polarizing the issue. *Fisheries*, 3: 4-5.

Daniel III, L.B., and Graves, J.E., 1994. Morphometric and genetic identification of eggs of spring- spawning Sciaenids in lower Chesapeake Bay, *Fishery Bulletin*, 92: 254-261.

Ditty, J. G. and R. F. Shaw, 1992. Larval development, distribution and ecology of cobia *Rachycentron canadum* (family: Rachycentridae) in the northern Gulf of Mexico. *Fish. Bull.*, 90: 668-677.

Donaldson, K.A., and Wilson, R.R.j., 1999. Amphi-Panamic Germinates of Snook (percoidie: Centropomidae) provide a calibration of the divergence rate in the mitochondrial DNA control region of fishes. *Molecular Phlogenetics and Evolution*, 13 (1): 208–213.

Dunham, R.A., 2004. *Aquaculture and Fisheries Biotechnology Genetic Approach*. CABI Publishing, Alabama, USA. 372 p.

Eckert, K. A., and Kunkel, T. A., 1995. The fidelity of DNA polymerase in the polymerase chain reaction. In: McPherson, M.J., and Quirke, P., and P. Taylor, G.R., (Eds.) *PCR2: A practical approach*, 225- 244. Oxford University Press, Oxford, UK.



Enayat, M.S., 2003. Restriction fragment length polymorphism, in: Methods in molecular biology, PCR mutation detection protocols, Theophilus, B. D. M., and Rapley, R., (Eds.), HUMANA Press, Vol. 187, 212 pp.

Farias, I. P., Orti, G., Sampaio, I., Schneider, H., and Meyer, A., 2001. The cytochrome of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. Journal of molecular Evolution, 53 (2): 89– 103.

Faulk, C. K. and Holt, G. J., 2006. Responses of coho *Rachycentron canadum* larvae to abrupt or gradual changes in salinity, Aquaculture, 254: 275– 283.

Ferguson, A., Taggart, J. B., Prodohl, P. A., McMeel, O., Thompson, C., Stone, C., McGinnity, P., and Hynes, R.A., 1995. The application of molecular markers to the study and conservation of fish population, with special reference to *Salmo*. Journal of fish Biology, 47: 103–126.

Fisheries and aquaculture information and statistics service, 2000. FAO.

Gold, J. R., Richardson, L. R., Furman, C. and king, T. L., 1993. Mitochondrial DNA differentiation and population structure in red drum (*sciaenops ocellatus*) from the Gulf of Mexico and Atlantic Ocean. Marine Biology, 116:175–185.

Gold steine, D. B. and Schlotterer, C., 1998. Microsatellite: Evolution and Application, Oxford university press, 320 P.

Graves, J. E., McDowell, J.R. and Jones, M.L., 1992. A genetic analysis of weakfish *Cynoscion regalis* stock structure along the mid–Atlantic coast. Fish. Bull., 90: 469– 475.

Gross, R., Nilsson, J., 1999. Restriction fragment length polymorphism at the growth hormone 1 gene in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and its association with weight among the offspring of a hatchery stock, Aquaculture, 173: 73–80.

Gross, R., Kohlmann, K. and Kersten, P., 2002. PCR-RFLP analysis of the mitochondrial ND-3/4 and ND-5/6 gene polymorphisms in the European and East Asian subspecies of Common carp (*Cyprinus carpio* L.), Aquaculture, 204: 507– 516.

Guilliatt, A. M., 2003. Agarose and polyacrylamide gel electrophoresis, in: Methods in molecular biology, PCR mutation detection protocols, Theophilus, B. D. M., and Rapley, R., (Eds.), HUMANA Press, Vol. 187, 212 pp.

Gyllester, U. B., Wharton, D., Josefsson, A. and Willson, A. C., 1991. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice, *Nature*, 352: 255–257.

Hall, H. G., 1999. Modification of the AFLP protocol applied to honey bee (*Apis mellifera*). *DNA. Biotechniques*, 26: 704-709.

Hanson, M. M., Mensberg, K. D., Rasmussen, G. and Simonsen V., 1997. Genetic variation within and among Danish brown trout (*Salmo trutta* L.) hatchery strains, assessed by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA segments. *Aquaculture*, 153: 15– 29.

Hanson, M. M., 2003. Application of molecular markers in population and conservation genetics, with special emphasis on fishes. DSc thesis, faculty of natural sciences, university of Aarhus, 68 pp.

Hassler, W. W. and R. P. Rainville, 1975. Techniques for hatching and rearing Cobia, *Rachycentron canadum*, Through larval and juvenile stages. Univ. N.C. Sea grant coll. Prog., Raleigh, USA. UNC-SG-73-30, 26 pp.

Heist, E.J., and Gold, J.R., 1994. Microsatellite DNA variation in sandbar sharks (*Carcharhinus plumbeus*) from the Gulf of Mexico and mid-Atlantic bight. *Copeia*, 1: 182–186.

Hilsdorf, A. W. S., Azeredo-Espin, A. M. L., Krieger, M. H., and Krieger, J. E., 2002. Mitochondrial DNA diversity in wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiformes, characidae, Bryconinae) from the paraibo do sul Basin- Brazil. *Aquaculture*, 214: 81-91.

Holt, G. J., Faulk, C. K., Swarchz, M. H., 2007. A review on larval culture of Cobia *Rachycentron canadum*, a warm water marine fish, *Aquaculture* 268: 181-187.

Innes, B. H., Grewe, P. M., and ward, R. D., 1998. PCR-based genetic identification of marine and other billfish. *Marine and freshwater research*, 49: 383-388.

Jones, N. L., 2003. PCR Principles, procedures and parameters, in: *Methods in molecular biology, PCR mutation detection protocols*, Theophilus, B. D. M., and Rapley, R., (Eds.), HUMANA Press, Vol. 187, 212 pp.

Kaiser, J. B. and G. J. Holt, 2005. Species profile Cobia. SRAC publication, No, 7202.

Kohlman, K., Gross, R., Murakaeva, A. and Skersten, P., 2003. Genetic variability and structure of Common carp populations throughout the distribution range inferred from allozyme, micro satellite and mtDNA markers. *Aquaculture Living Resources*. 16: 421– 431.

Koskinen, M. T., 2002. Genetic studies of population history and contemporary microevolution in grayling (*Thymallus*: Salmonidae), Blackwell Science, 33 p.

Lehoczky, I., Jeney, Z., Magyary, I., Hancz, C. and Kohlmann, K., 2005. Preliminary data on genetic variability and purity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) strains kept at the live gene bank at Research Institute for Fisheries, Aquaculture and Irrigation (HAKI) Szarvas, Hungary, *Aquaculture*, 247: 45- 49.

Liao, I. C., Huang, T.-S., Tsai, W.-S., Hsueh, C.-M., Chang, S.-L. and Leañó, E. M., 2004. Cobia culture in Taiwan: current status and problems, *Aquaculture*, 237: 155-165.

Liao, I. C., Su, H. M. and Chang, E. Y., 2001. Techniques in finfish larviculture in Taiwan, *Aquaculture*, 200: 1-31.

Liu Z. j. and Cordes J. F., 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238: 1-37.

Liu, C., Liu, L., Wang, Z. and Li, Y., 2005. Studies on molecular genetic characteristics of cobia *Rachycentron canadum*, *Journal of tropical oceanography*, 44: 77–85.

Mabuchi, K., Senou, H., Suzuki, T. and Nishida, M., 2005. Discovery of an ancient lineage of *cyprinus carpio* from lake Biwa, central Japan, based on mtDNA sequence data, with reference to possible multiple origins of Koi., *J. fish Biol.*, 66:1516–1528.

Magoulas, A., 1998. Application of molecular markers to aquaculture and broodstock management with special emphasis on microsatellite DNA. *Cahiers Options Mediterrannes*, 34: 153–168.

Mai, K., Xiao, L., Ai, Q., Wang, X., Xu, W., Zhang, W., Liufu, Z., and Ren, M., 2009. Dietary choline requirement for juvenile Cobia *Rachycentron canadum*, *Aquaculture*, 289: 124-128.

Memis, D., and Kohlmann, K., 2006. Genetic characterization of wild common carp (*Cyprinus carpio* L.) from Turkey, *Aquaculture*, 258: 257– 262.

McPherson, M., and MØller, S., 2006. PCR, Second edition. Taylor & Francis Group, Norway. 292 p.

Morán P., Pendás, A.M. and García-Vázquez, E., 1995. Mitochondrial DNA variation in wild and hatchery brown trout (*Salmo trutta* L.) populations from Spain, *Aquaculture*, 141: 59–65.

Mullis, K., and Faloona, F., 1986. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155: 335- 350.

Nakamura, H., 2007. Cobia culture in Okinawa. In: Liao, I.C., Leano, E.M., (Eds.), *Cobia Aquaculture: Research, Development and commercial production*. Asian Fisheries Society, Manilla, Philippines, World Aquaculture Society, Louisiana, USA, The Fisheries Society of Taiwan, Keelung, Taiwan, and National Taiwan Ocean University, Keelung, Taiwan, 97-103.

Nei, M. and Tajima, F., 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*, 97: 145–163.

OkumuŞ, İ., and çiftci, Y., 2003. Fish population genetic and molecular markers: II– Molecular markers and their application in fisheries and aquaculture, *Turkish Journal of fisheries and aquatic sciences*, 3: 51–79.

Ovenden, J. R., and Brasher, D. J., 1994. Stock identity of the red and green rock lobsters inferred from mitochondrial DNA analysis, In: *Spring lobster management*. (Eds B. F., Phillips, J. S., cob and J., Kittaka). Blackwell scientific publication. Oxford. 230-249.

Ovenden, J. R., 1990. Mitochondrial DNA and marine stock assessment : a review. *Fresh water Res.*, 41: 835– 853.

Prutte, C. L., Saillant, E., Renshaw, M. A., Patton, J. C., Rexroad, C. E. and Gold, J. R., 2005. Microsatellite DNA markers for parentage assignment and population genetic studies in cobia, *Rachycentron canadum*. *Molecular Ecology Notes*. 5: 84– 86.

Renshaw, M. A., Pruett, C. L., Saillant, E., Patton, J. C., Rexroad, C. E. and Gold, J. R., 2005. Microsatellite markers for cobia, *Rachycentron canadum*, *Gulf of Mexico Science*, 23: 248- 251.

Resley, M. J., Webb j. r., K. A., Holt, G. J., 2006, Growth and survival of juvenile Cobia *Rachycentron canadum* at different salinities in a recirculating aquaculture system, *Aquaculture*, 253: 398-407.

Saccone, C., Giorgi, C.O., Gissi, C., Pesole, G., and Reyes, A., 1999. Evolutionary genomics in metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene*, 238: 195–209.

Shaffer, R.V., and Nakamura, E.L., 1989. Synopsis of biological data on the Cobia, *Rachycentron canadum* (Pisces: Rachycentridae). NOAA technical report NMFS 82, FAO fisheries synopsis, 153: 21 p.

Skibinski, D.O.F., 1994. The potential of DNA techniques in the population and evolutionary genetics of aquatic invertebrates. In: *Proceedings of the conference on Genetics and Evolution of Aquatic organisms*, 10-16 sept 1992, Bangor, Uk. (Beaumont, A., ed.). Chapman and Hall, London: 177–199.

Su, M.S., Chien, Y.H., Liao, I.C., 2000. Potential of marine cage aquaculture in Taiwan: Cobia culture. In: Liao, I.C., Lin, C.K., (eds.). *Cage Aquaculture in Asia: Proceeding of the first international symposium on cage aquaculture in Asia*. Asian Fisheries Society, Manilla, and World Aquaculture Society- Southeast Asian Chapter, Bangkok. 97-106.

Taggart, J., 1992. Protocol for genomic DNA extraction from fish muscle.

Thai, B. T., Pham, T. A. and Austin, G. M., 2006. Genetic diversity of common carp in Vietnam using direct sequencing and SSCP analysis of the mitochondrial DNA control region. *Aquaculture*, 258: 228– 240.

Theophilus, B.D.M. and Rapley, R., 2003. *Methods in Molecular Biology, PCR Mutation Detection Protocols*, Humana press, 187: 192 pp.

Upholt, W. B., and Dawid, I. B., 1977. Mapping of mitochondrial DNA of individual sheep and goats, rapid evolution in the control region, *Cell*, 11: 571–583.

Vrijenhoek, R.C., Douglas, M.E., Meffe, G.K., 1995. Conservation genetics of endangered fish population in Arizona. *Science*, 229: 400-402.

Vawter, L., and Brown, W. M., 1986. Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. *Science*, 234: 194–196.

Waldman, J. R., 1999. The importance of the comparative studies in stock analysis. Fisheries research, 43: 237- 246.

Williamson, J. H., 2001. Broodstock management for imperilled and other fishes. In G. A. wedemeyer, (Ed.). Fish hatchery management, second edition. American fisheries society, Bethesda, Maryland: 397–482.

Wilson, A. C., Cann, R. L., Carr, S. M., George, M. Gyllensten, U.B., Helm–Bychowski, K. M., Higuchi, R. G., Palumbi, S. R., Prager, E. M. etal., 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. Biol. J. Linn. Soc., 26: 375–400.

Zhang, J., Huang, H., Cai, Z., and Huang, L., 2006. Species identification in salted products of red Snappers by Semi- nested PCR-RFLP based on the mitochondrial 12S rRNA gene sequence. Food control, 17: 557-563.

## Abstract

Cobia is a native fish species in Iranian waters in the Persian Gulf and Sea of Oman and has a good internal and foreign market. This fish is a fast growing species and for this reason Iranian Fisheries is considering to go for its culture practices. To go for any utilization such as fishing from wild stocks or culture activities, needs a better understanding of its peculiarities and genetic characteristics of its natural resources. Therefore, this project was described and conducted.

In this investigation, cuts 2 or 3 cm of fin tissue of 120 specimen of Cobia obtained from Sistan and Baluchistan, Hormozgan, Bushehr and Khuzestan water provinces, were collected. DNA was extracted by Phenol-chloroform method and produced PCR product in length of 1060 and 1450 base pair of two mitochondrial genes COI and ND2.

Using 13 cutting enzymes (4 enzymes were suitable for both of genes), 205 base pair (from 2510 base pair, equal with 3/8 from gene remains) were directly investigated. But binding patterns of enzymatic digestion of PCR products of both COI and ND2 genes from electrophoresis were monomorphic in all samples and no polymorphism was observed. This may be attributed to the unsuitable choice of COI and ND2 genes for showing of intraspecific divergence. But in general non-existence of genetic diversity or noticeable decrease of that among individuals has been reported in regions where fish migration exist and they can freely move between two regions. Therefore, non-observation of polymorphism in the study area might be the case and indicates represents the area.

On the other hand, some scientists believe that the distributions of populations in different regions are greatly affected by environmental and physical and ecological factors. Although Cobia is a migratory fish, but with regard to the fact that the environmental conditions are different (specially temperature and salinity) between east and west of Persian Gulf and Oman sea, there is a possibility that different genetic groups of this species exist in the regions. Of course It is clear that using more samples and enzymes from other genetically regions could produce better results.

Since none of the two investigated genes didn't show genetic divergence or polymorphism amongst the individuals of one region or between different regions, therefore, statistic analysis for estimating of haplotype diversity or nucleotide diversity and drawing of relationship tree among individuals using available softwares was not possible.



**Islamic Azad University**  
**Sciences and Research Branch**

**Thesis Presented for the Degree of  
Doctorate of Philosophy (Ph.D)  
in the Field of Fisheries**

**Investigation of Polymorphism by PCR-RFLP Method  
in Cobia fish *Rachycentron canadum*  
in the Persian Gulf and Oman Sea**

**Bahram Kazemi Damane**  
**Supervier**

**Mehdi Soltani**  
**Seyed Mohammad Reza Fatemi**  
**Advisors**

**Maryam Tala**  
**PhD. candidate**

**2009 –2010**